

**Untersuchungen zur Metabolisierung
eines radioaktiv markierten, gastrinanalogen
Oktapeptids durch die Rattenleber**

Walter Leuze

1971

Aus der Chirurgischen Poliklinik

der Universität München

Direktor :Prof. Dr. F.Holle

Untersuchungen zur Metabolisierung eines radioaktiv
markierten, gastrinanalogen Oktapeptids durch die
Rattenleber

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Walter Leuze
aus Mühlendorf
München 1971

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Dr. I. Klempa
Mitberichterstatter : Prof. Dr. F. Holle
Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 9. 11. 1971



Meinen Eltern in
Dankbarkeit gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553801_0032

Einleitung

Historische Entwicklung der Gastrinidentifizierung	1
--	---

Problemstellung und Zielsetzung 5Methodik

1. Beschreibung des Materials	7
2. Beschreibung der Versuche	7
2.1. Gewinnung des Leberhomogenates	8
2.2. Gewinnung des Inkubats	8
2.3. Abtrennung der corpuskulären Bestandteile des Inkubats	9
2.4. Radioaktivitätsmessung mit flüssigen Scintillatoren	9
2.5. Gesamteiweißbestimmung mit Biuretreaktion	12
2.6. Einengung des Untersuchungsmaterials	12
2.7. Fraktionierte Auftrennung durch Säulenchromatographie	13
2.8. Spaltung von Wasserstoffbrücken durch Harnstoffdenaturierung	16
2.9. Methoden zur Gewinnung von Spaltprodukten	17
2.10. Bestimmung von Mucoiden und Kohlehydraten	18

2.11. Vergleichende Auftrennung und Identifizierung mit Hochspannungselektrophorese und Dünnschichtchromatographie	19
3. Schematische Darstellung der Versuchsabläufe	27
<u>Ergebnisse</u>	28
<u>Diskussion der eigenen Versuchsergebnisse</u>	52
<u>Zusammenfassung</u>	57
Literaturverzeichnis	58
Lebenslauf	61

Historische Entwicklung der Gastrin-Identifizierung

Am 18.5.1905 wurde die klassische Mitteilung "On the chemical mechanism of gastric secretion" von John Sidney Edkins, Dozent für Physiologie, vorgetragen, in welcher er die Existenz eines antralen säurestimulierenden Hormons postulierte: "Aufgrund von experimentellen Ergebnissen konnte vermutet werden, daß bei Nahrungsaufnahme im Antrum ein säurestimulierendes Hormon freigesetzt wird." J.S. Edkins nannte, in Anlehnung an das von Bayliss (1860 - 1927) und E.H. Starling (1866 - 1927) 1902 gefundene Hormon Sekretin, das nach Nahrungsaufnahme im Antrum entstehende, säurefördernde Prinzip Gastrin. Diese Darstellung Edkins erfolgte als Hypothese seiner experimentellen Ergebnisse. Für eine experimentelle Beweisführung bemühte er sich nicht.

Simon A. Komarov (1892 - 1964) lieferte 1938 und 1942 entscheidende Beiträge für die Isolierung des Antrums-hormons: Aus sauren Antrumschleimhautextrakten von Schweinen, Katzen und Hunden fällte S.A. Komarov mit Tricloressigsäure eine Proteinfraction, welche histaminfrei war und bei intravenöser Applikation die Magen- und Pankreassekretion stimulierte. S.A. Komarovs Extrakte waren aber bei subkutaner Injektion inaktiv.

Die Krönung einer jahrelangen präparatorischen Arbeit der Arbeitsgruppe von R.A. Gregory und seiner Mitarbeiterin H. Tracy war 1961 die Erarbeitung einer geeigneten Extraktionsmethode. Zum erstenmal konnte eine Gastrinsubstanz zur Verfügung gestellt werden, welche sich auch bei subkutaner Injektion als stark sekretorisch wirksames Stimulans bei nicht narkotisiertem Hund erwies. Auf der weiteren Suche nach der biologischen Identifizierung des antralen Hormons gelang R.A. Gregory und H. Tracy 1964 eine praktisch im größeren Rahmen anwendbare Methode auszuarbeiten. Endprodukt der Extraktionsverfahren waren zwei niedermolekulare Peptide: Gastrin I und Gastrin II sind niedermolekulare Polypeptide mit Heptadecapeptidstruktur. (17 Aminosäuren mit definierter Sequenz, Molekulargewicht 2114). Gastrin II unterscheidet sich von Gastrin I durch eine Phenolsulphatestergruppe am Tyrosinradikal. Beide isolierten Gastrinpräparate zeigen bezüglich ihrer physiologischen Wirkung keinerlei Unterschiede.

1964 gelang die Strukturaufklärung und Synthese von Gastrin I und Gastrin II zunächst vom Schweinemagen. (J.C. Anderson und Mitarbeiter; R.A. Gregory und Mitarbeiter). 1966 erfolgte dann die Reindarstellung des

menschlichen Gastrins. (R.A. Gregory, H. Tracy, M. I. Grossmann). (1)

Die Entdeckung des Gastrins bedeutet für die Magenphysiologie wie auch für die klinische Medizin einen großen Fortschritt. Die Stimulation der Sekretion im Tierversuch oder bei Menschen mit dem Hormon oder synthetischen, gastrinspezifischen Präparaten zeigte, daß möglicherweise eine Reihe von Vorstellungen über die sekretorische Magenfunktion revidiert werden müssen. (2) Auch die Bedeutung von Gastrin für die Ulkuserkrankung und Chirurgie ist unbekannt. Darüber hinaus bietet sich der pharmakologischen Forschung das Problem an, nach spezifischen Inhibitoren für das antrale Hormon zu suchen. (3) Außerdem gewinnen in zunehmendem Maße Gastrin und gastrinspezifische Oligopeptide Bedeutung bei der Magen-testung.

1964 überprüften H. Tracy, R.A. Gregory zusammen mit J.S. Morley systematisch die physiologischen Eigenschaften von verschiedenen synthetischen Oligopeptiden, welche bezüglich ihrer Struktur Bausteine für Gastrin darstellen. Interessanterweise wies von den 17 Peptidstrukturen nur die C-Terminale Tetrapeptidsequenz alle Eigenschaften des natürlichen Gastrins auf. Auch Untersuchungen von R.F. Lick und Mitarbei-

ter konnten bestätigen, daß bei Magenfistelhunden unter verschiedenen pharmakologischen Bedingungen die biologische Wirksamkeit des C-terminalen Tetrapeptids der des nach Stimulation der gastralen Phase freigesetzten Gastrins entsprach. Während Histamin in der Leber weitgehend inaktiviert wird, entfaltet Gastrin auch nach intraportaler Injektion eine ungehinderte sekretorische Aktivität. R.F. Lick und Mitarbeiter konnten diese Befunde an Heidenhain-Fistelhunden bestätigen, darüber hinaus aber zeigen, daß das synthetische Tetrapeptid in der Leber partielle Inaktivierung erfährt. Über das metabolische Schicksal des Gastrin und gastrinähnlicher Oligopeptide ist nichts bekannt.

Probelmstellung und Zielsetzung

Im Zuge der synthetischen Gewinnung von Gastrin im Peptidlabor des Max-Planck-Institutes für Leder- und Eiweißforschung wurde ein gastrinspezifisch wirkendes Oktapeptid gefunden. Durch die radioaktive Markierung dieses Oktapeptids war die Verfolgung im Stoffwechsel von Ratten möglich. So wurde von R.F. Lick und E. Eberhagen in Urethannarkose nach Pylorusligatur bei Ratten das Oktapeptid intramuskulär injiziert und die Versuchstiere 20 Minuten später getötet. Sie stellten ein Verteilungsmuster der Radioaktivitätsmaxima in den verschiedenen Organen der Ratten auf. (4) Tab.S. 6

Maximale Werte der Radioaktivität fanden sie dabei im Überstand des Leberhomogenates. Dieser Befund sprach dafür, daß die Leber für den Stoffwechsel des Oktapeptids von Bedeutung ist.

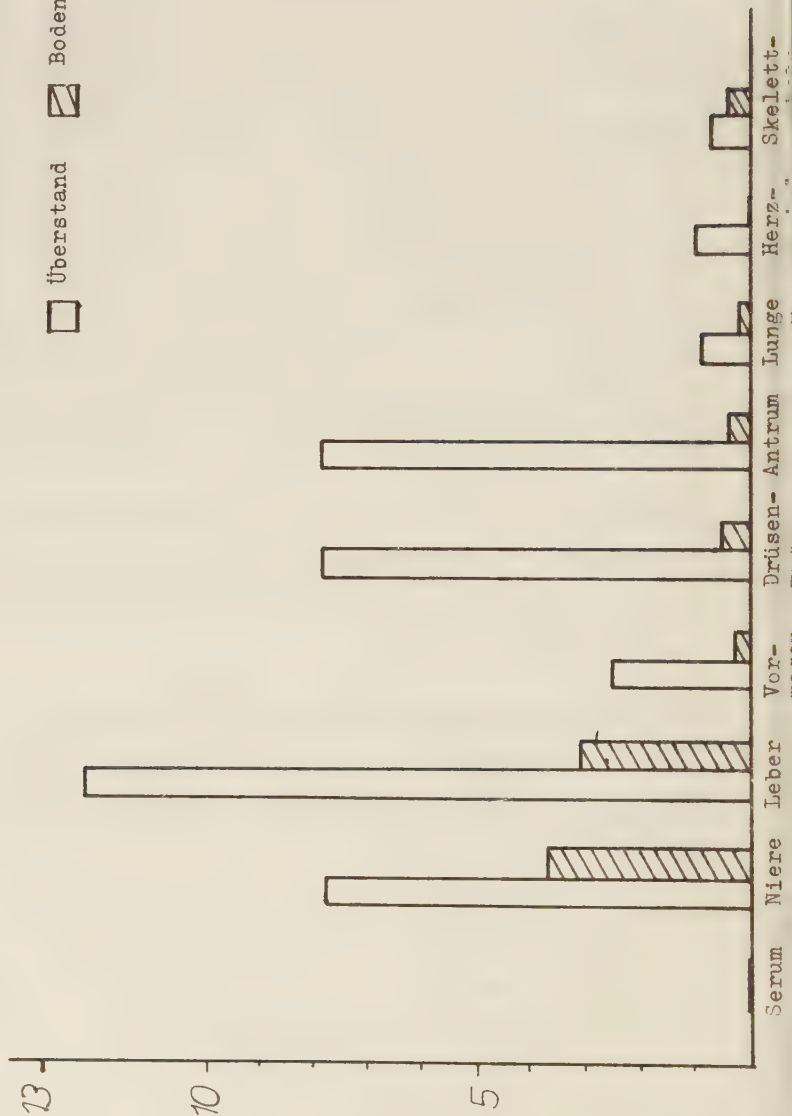
Bei der vorliegenden Arbeit sollte das metabolische Schicksal des gastrinspezifischen Oktapeptids in in-vitro Versuchen am Leberhomogenat von Ratten geklärt werden.

Ipm pro mg Rattengewebe in
Überstand und Bodensatz

Gewebeaufarbeitung 3 Std. nach
intramuskulärer Injektion des Oktapeptids

□ Überstand ▨ Bodensatz

$\text{Ipm/mg} \times 10^3$



Methodik:

1. Beschreibung des Materials:

Als gastrinspezifisch wirkende Substanz wurde ein vom Peptidlabor des Max-Planck-Institutes für Leder- und Eiweißforschung geliefertes Oktapeptid genommen, in dem das C-terminale Tetrapeptid enthalten ist.

Die Sequenz lautet:

BOC- Gly- Ala - Tyr - Gly - Trp - Met - Asp - The NH₂

Die BOC-Gruppe ($\text{CH}_3 - \underset{\text{CH}_3}{\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}} - \overset{3}{\text{O}} - \text{C} -$) dient als Schutz-

gruppe. Die Maskierung war nach Angaben des Herstellers notwendig, um den Zerfall zu verhindern.

Um das Oktapeptid im Stoffwechsel besser verfolgen zu können, wurde ein Tritiumatom am ersten Glycin eingebaut. In der Sequenz des Gastrins liegt dieses erste tritiummarkierte Glycin nicht. Es wurde an das Heptapeptid angebaut, um das Löslichkeitsverhalten zu verbessern. In wässriger Lösung blieb es schwer löslich, das zu den Versuchen gelieferte Material war in schwacher Natronlauge bei einem pH von 7,4 - 8,0 gelöst.

2. Beschreibung der Versuche:

Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse war die temperatur- und zeitgebun-

dene Verarbeitung.

2.1. Gewinnung des Leberhomogenats:

Für die Versuche wurden Sprague-Dawley-Ratten der gleichen Zucht mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 150 - 250 g verwendet. In Äthernarkose wurden die Ratten nach dem Öffnen von Bauch und Brusthöhle durch Schnitt in den Herzmuskel getötet. Die Leber wurde in toto herausgenommen, auf gekühlten Schalen von groben Bindegewebsanteilen befreit und auf einer Halbmikrowaage gewogen.

Zur Leber wurde die zehnfache Menge des Lebergewichtes gekühlter Phosphatpuffer nach Soerensen mit pH 7,2 gegeben. In einem Potter-Elvehjem-Pistill-Homogenisator wurde das Gemisch unter Eiskühlung bei ca. 1000 Drehungen pro Minute homogenisiert. (5)

2.2. Gewinnung des Inkubats:

Jeweils 5 ml des Homogenats wurden in einem Warburg-Inkubations-Glasgefäß mit 0,5 ml des radioaktivmarkierten Oktapeptids vermischt. Im 36,5°C warmen Wasserbad des Warburg-Gerätes wurde 2 Std. in Luft inkubiert. Zum Nachwaschen der Inkubationsgefäße nach Entleerung

des Inkubats wurde 1,0 ml physiologische Kochsalzlösung genommen.

2.3. Abtrennung der korpuskulären Bestandteile des Inkubats:

Die 6,0 ml des gewonnenen Inkubats werden in der L-2 Beckmann Ultra-Zentrifuge mit Rotor 50 30 Min. lang bei 0°C mit 40 000 Umdrehungen pro Min. (89160 g) zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und sein Volumen bestimmt. Der Bodensatz wird mit 5,0 ml isotonischer Kochsalzlösung aufgeschlämmt. (6) Für die Zuordnung des Oktapeptids oder dessen Metaboliten zum Überstand und Bodensatz war die Radioaktivitätsbestimmung notwendig.

2.4. Radioaktivitätsmessung mit flüssigen Scintillatoren:

Bei den während den Untersuchungen anfallenden Substanzgemischen mußte zum Nachweis und zur Erkennung der radioaktivmarkierten Substanz eine Radioaktivitätsbestimmung durchgeführt werden. Als vorteilhafte Methode dazu zeigte sich das Verfahren mit flüssigen Scintillatoren im "Packard-Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer". Die zu bestimmende Substanzlösungen betrugen je-

weils 0,2 ml. Als Scintillationsflüssigkeit fand 5,0 ml Scintillator nach Bray Verwendung, der sich zur Messung von wässrigen radioaktiven Lösungen am besten bewährt hat. (7)

Hier war die Aufstellung eines eigenen Spektrogramms für die zu bestimmenden Substanzen notwendig.

Die Einstellung des Gerätes bei einem Gainwert von 15 und einem Leerwert von 30 Ipm war optimal.

Die Zählausbeutung schwankte zwischen 5 und 10 %.

Sämtliche Zählwerke wurden in den ersten Versuchsreihen mit dem Quenchwert korrigiert. Im bestimmten

Volumenverhältnis wurde tritiiertes Wasser mit bekannter Impulsrate zugegeben. Aus der Differenz der

Zählwerte "Ist und Soll" kann man den inneren

Löschwert der Substanz bestimmen, d.h. den Wert, mit

dem der Ist-Wert zu multiplizieren ist, um zur vollen

Zählausbeute zu gelangen. Bei diesen Versuchsreihen

stellte sich heraus, daß die Zählwerte im Verhältnis

zueinander gleich sind. Weitere Quenchbestimmungen

wurden deshalb bei späteren Versuchen nicht

durchgeführt.

Ein gutes, flüssiges Scintillatorsystem fordert, gute Löslichkeit für die radioaktive Substanz.

Es mußte deshalb zur Radioaktivitätsbestimmung für die verschiedenen Bodensätze aus Trichloressigsäure-

fällung , Dialyse und Ultrazentrifugation ein anderes Scintillationssystem gewählt werden. Im Bray-System fiel ein milchiger Niederschlag aus, der eine Impulszählung nicht ermöglichte. Als anwendbares Scintillationssystem ergab sich das Hyamin-Toluol-System (8). Die Einstellung des Tri-Carbs nach eigenem Spektrogramm: Gain 20, Leerwert 100 Ipm. Die Zählausbeute betrug ca. 18%.

Die Zählproben wurden jeweils 10 Min. auf zwei Kanälen gezählt, dann der Mittelwert gezogen. Um vergleichbare Ergebnisse zu bekommen, mußte die Zeit vom Einbringen des Scintillations-systems zur radioaktiven Substanz bis zur Zählung im Tri-Carb gleich lang sein. Temperaturunterschiede waren zu vermeiden.

Die Impulsraten aus dem Zählgerät gaben den Wert pro 0,2 ml. Substanzlösung. Wegen der unterschiedlichen Substanzkonzentration in den verschiedenen zur Radioaktivitätsbestimmung genommenen Substanz-lösung mußte, um die Ergebnisse vergleichen zu können, ein festes Bezugssystem geschaffen werden. So wurden die Radioaktivitätswerte pro Gramm Leber Frischgewicht berechnet. Dazu war die quantitative Eiweißbestimmung der einzelnen Substanzlösungen notwendig.

2.5. Gesamteiweißbestimmung mit der Biuretreaktion:

Die violetten Komplexe, die aus Protein und Kupfer (II) Ionen in alkalischer Lösung entstehen, dienen zur photometrischen quantitativen Proteinbestimmung (9).

Ansätze: 0,2 ml Substanzlösung

0,1 ml Standardlösung

0,1 ml Wasser

+ jeweils 5,0 ml Biuretreagens.

Nach 30 Min. Stehen bei Raumtemperatur wurden die Extinktionen von Meßlösungen und Standardlösungen bei 564 nm in 1 cm Küvetten gegen den Leerwert gemessen.

$$\text{Konzentration Probe} = \frac{E_{\text{Probe}}}{E_{\text{Standard}}} \times \text{Konzentration Standard}$$

2.6. Einengung des Untersuchungsmaterials :

2.6.1. Enteiweißung des Ultrazentrifugationsüberstandes mit Trichloressigsäure (10):

Zur Untersuchung, ob das inkubierte Oktapeptid an Eiweißkörper gebunden ist, diente die Trichloressigsäurefällung. Zu 0,5 ml Überstand wurden 2,0 ml 10% TCE gegeben und unter Kühlung gemischt. Der Niederschlag wurde zentrifugiert, der Überstand gesammelt,; der Bodensatz erneut mit 0,5 ml TCE versetzt, zentrifugiert und der Über-

stand abgegossen. Je 0,2 ml Bodensatzlösung und Überstand werden zur Radioaktivitätsbestimmung weiter verarbeitet.

2.6.2. Dialyse des Ultrazentrifugationsüberstandes (11):

Dazu wurde 1,0 ml Überstand in einen gut befeuchteten Dialysierschlauch (von Kalle, Durchmesser 20 mm) gefüllt, auf der Halbmikrowaage gewogen und an einen Rührer in einem Dialysierbad auf 500 ml Puffer nach Soerensen mit pH 7,2 gegeben. Die Dialyse erfolgte unter Kühlung bei 3 bis 4°C. Nach 12 Stunden und dreimaligem Wechsel des Dialysierbades wurde der Inhalt des Dialysiersackes wieder gewogen und zur Radioaktivitätsbestimmung, wie auf S. 11 beschrieben, weiterverarbeitet. Die gesammelte Dialyseflüssigkeit wurde gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde zur Radioaktivitätsbestimmung und für weitere Versuche in Soerensen-Puffer mit pH 7,2 gelöst.

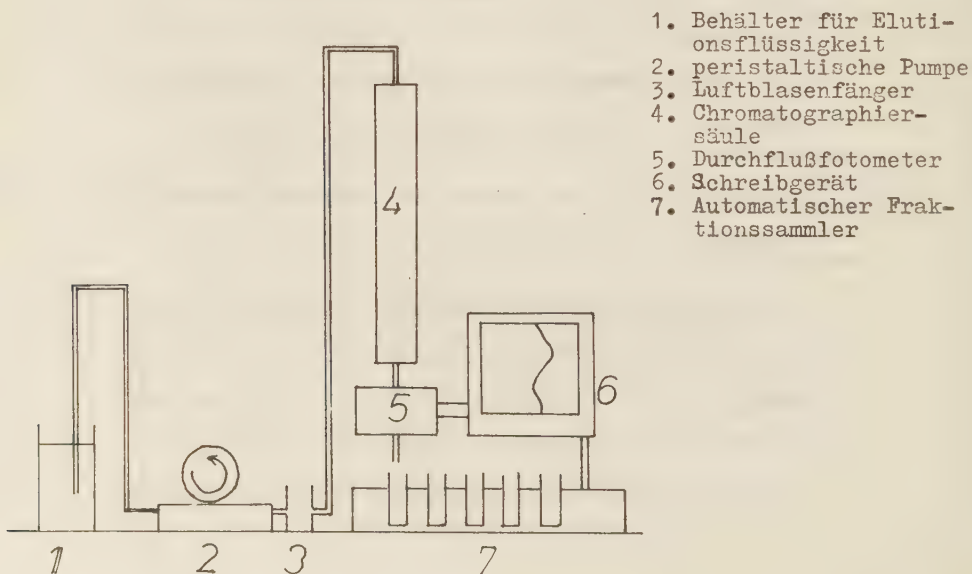
2.7. Fraktionierte Auftrennung der Substanzlösungen durch Säulenchromatographie (12):

Molekulargewichts- und Molekülgrößenunterschiede sind Eigenschaften, die die Trennung der einzelnen Moleküle mit Gelchromatographie ermöglichen. Das von der Molekülgröße abhängige Elutionsvolumen kann man bei ein und derselben Säule als Para-

meter verwenden. V_E (Elutionsvolumen) wurde aus Zeit- und Durchlaufvolumen pro Minute bestimmt. Da die Durchlaufgeschwindigkeit konstant gehalten wurde, konnte die Zeit allein als vergleichender Maßstab genommen werden.

Material: Als hydrophiles Gel diente Sephadex mit den Perlgrößen G 15 und G 25 finde , als Elutionsflüssigkeit Soerensen-Puffer mit ph 8. Die Chromatographiesäulen stammen von Fa. Pharmazia, Upsala, Schweden. Länge 30 und 60mm Durchmesser 9 mm.

Versuchsanordnung:



Durchführung: Vorbereitung und Beschicken der Chromatographiersäulen mit Sephadex G 25 fine und G 15 fine wurden nach Anleitung H. DETTERMANN durchgeführt.(12). Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug 16 ml/h.

Säulenchromatographisch wurden folgende Lösungen untersucht:

- 0,5 ml von 1,0 ml Puffer nach Soerensen mit pH 7,2 + 0,2 ml Oktapeptid + 0,2 ml Tetrapeptid.
- 0,5 ml ultrazentrifugierter Überstand (nicht inkubiert) + 0,05 ml Oktapeptid + 0,05 Tetrapeptid.
- 0,5 ml des Inkubats (von 5,0 ml Homogenat + 0,5 ml Oktapeptid).
- 0,5 ml nach Harnstoffspaltung des Überstandes
- 0,5 ml nach der enzymatischen Spaltung des Überstandes und des Lyophilisats.
- 0,5 ml nach der Säurehydrolyse des Überstandes.

Das Eluat wurde kontinuierlich und automatisch auf die Anwesenheit gelöster Stoffe untersucht und im Fraktionssammler gesammelt. Durch das Durchflußphotometer registrierte prozentuale Durchlässigkeit

keit war der Konzentration proportional, die Meßwerte wurden auf einem Schreiber in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet. Gleichzeitig wurde durch den Schreiber die Weiterschaltung des Fraktionssammlers markiert, so daß die Zuordnung der Fraktionen und ihrer später gemessenen Impuls-
werte zur Substanzkurve eindeutig festzustellen war.

2.8. Spaltung von Wasserstoffbrücken durch Harnstoffdenaturierung (13):

Harnstoff hat die Fähigkeit Wasserstoffbrücken zu bilden. Diese Wasserstoffbrücken haben eine höhere Bindungsenergie als die Wasserstoffbrücken zwischen den CO- und NH-Gruppen in den Peptidketten der Eiweiße. Daher tritt der Zusatz von Harnstoff zu Eiweißlösungen eine Konkurrenz des Harnstoffs mit den Peptidbindungen um die Ausbildung von Wasserstoffbrücken auf. Sollte bei den Untersuchungen das markierte Oktapeptid durch Wasserstoffbrücken an Proteinstrukturen gebunden sein, so wird durch die Anwendung von Harnstoff mit steigender Konzentration und bei wechselnden pH-Werten das Oktapeptid abgespalten.

Durchführung: Zu 1 ml ultrazentrifugierten Überstand wurde Harnstoff in den Mengen

120,1, 180,0, 240,0 und 300,0 mg gegeben, was einen Anstieg der Molarität von 4 auf 12 bedeutet. Die Versuche wurden bei einem ph-Wert von 7,2, 4,0 und 9,0 durchgeführt. Der ph-Wert von 4,0 wurde mit 1 n HCl eingestellt, der ph-Wert 9,0 durch 1 n NaOH. Je 0,5 ml der gewonnenen Lösungen wurden säulenchromatographisch getrennt, bei den gesammelten Fraktionen Radioaktivitätsbestimmungen durchgeführt.

2.9. Methoden zur Gewinnung von Spaltprodukten, die zur Identifizierung möglicher Metaboliten dienen:

2.9.1. Säurehydrolyse des ultrazentrifugierten Überstandes:

2 ml ultrazentrifugierter Überstand (entsprechen ca. 16mg Protein) wurden mit 100 ml 6 n HCl 14 Stunden am Rückflußkühler in einem 100°C heißen Ölbad gekocht. Das dunkel gefärbte Zersetzungsprodukt (Humine) wurde abgefiltert, das Filtrat entweder durch Eindampfen oder Gefrier-trocknen konzentriert, neutralisiert und säulenchromatographisch, hochspannungselektrophoretisch und dünnschichtchromatographisch weiterverarbeitet.

2.9.2. Enzymatische Trennung mit den Proteinasen

Pepsin und Trypsin (15):

Die vollständige Spaltung der Eiweißkörper in die Aminosäuren zu Vergleichszwecken wurde durch die Säurehydrolyse erreicht, bei der enzymatischen Trennung wird nur ein Teil der Peptidbindungen hydrolisiert.

2.9.2.1. Verfahren mit Trypsin:

Die hohe Spezifität dieses Enzyms ermöglichte die Isolierung definierter Bruchstücke. Trypsin spaltet Peptidbindungen überall dort, wo basische Aminosäuren Lysin oder Arginin vorkommen und zwar so, daß die Carboxylgruppe dieser Aminosäuren freigesetzt wird. Man erhält infolge dessen Peptide mit einer basischen Aminosäure am Carboxylende.

2.9.2.2. Verfahren mit Pepsin:

Die Spezifität dieses Enzyms ist nicht so groß. Synthetische Substrate spaltet es an aromatischen Aminosäuren. Bei der Versuchsreihe mit Trypsin wurde als Ausgangsmaterial das Lyophilisat aus der Dialyse genommen. Die Auftrennung der Verdauungslösungen erfolgte säulenchromatographisch. Die enzymatischen Spaltungsversuche

wurden nach den Angaben von H.U. BERG-MEYER (15) durchgeführt.

2.10. Bestimmung von Mucopolisacchariden und Kohlehydraten im fraktionierten Eluat der Säulenchromatographie:

Zur Klärung der Frage, ob das Radioaktivitätsmaximum mit dem Auftreten von Mucopolisacchariden zusammenhängt (16) und damit eine Bindung oder Anlagerung des markierten Oktapeptids anzunehmen war, wurde der Versuch nach BLIX zur Hexosaminbestimmung durchgeführt (17). Sie beruht auf der Elson-Morgan-Reaktion und erfaßt 10 - 50 µg Hexosamin.

Inwieweit ein Zusammenhang mit Kohlehydraten besteht, konnte durch die α -Naphthol-Schwefelsäure-Reaktion Klärung finden (18). Die Versuche wurden nach den Angaben der Autoren durchgeführt, die Messungen erfolgten im Beckmann DB Spektrophotometer. Diese letzte Methode war ursprünglich von Molisch als qualitativer Nachweis von Zucker beschrieben worden, gilt aber 1929 modifiziert, für quantitative Bestimmungen. Während die Molisch-Probe positiv für alle Kohlehydrate ist, außer Aminozucker, gibt die hier verwendete Modifikation die purpurne Farbe nur mit den wahren Zuckern.

2.11. Vergleichende Auftrennung und Identifizierung:

2.11.1. Hochspannungselektrophorese (19):

Die Hochspannungselektrophorese hat sich zur Trennung von Aminosäuren und Peptiden am meisten bewährt. Bei der Suche nach Spaltprodukten des radioaktiv markierten Peptids oder nach dem ganzen Molekül mußte auch die Hochspannungselektrophorese zu diesen Untersuchungen herangezogen werden. Hochspannungselektrophoretisch wurden getrennt:

- ultrazentrifugierter Überstand
- Fraktion mit maximaler Ipm nach Säulenchromatographie
- aus der Pepsinverdauung die säulenchromatographisch bestimmte Fraktion mit maximaler Ipm
- das Hydrolysat

Zu Vergleichszwecken :

- Oktapeptid
- Standardlösung I und II (sie wurden freundlicherweise von Prof. Novy, Medz. Poliklinik München, zur Verfügung gestellt).

Die Versuche wurden in einer Apparatur der Fa. Hölzl, München, durchgeführt. Als Trägermaterial wurde Papier von Schleicher und Schüll

Nr. 2043b benutzt. Das Auftragen der zu untersuchenden gelösten Substanzen erfolgte mit selbstgezogenen Plastikpipetten, die durch Aufziehen einer bekannten Flüssigkeitsmenge (Marburg-Pipette) geeicht worden waren. Folgende Puffer wurden verwendet:

- Formiatpuffer pH 1,9

Zusammensetzung:

Eisessig	:	Ameisensäure	:	aqua dest.
12	:	2,6	:	85,4

- Acetatpuffer pH 3,6

Zusammensetzung:

Pyridin	:	aqua dest.	:	Eisessig
1	:	89	:	10

Durch Probetrennungen wurde festgestellt, daß bei 8 KV und 2 Std. Laufzeit eine genügende Auftrennung erfolgte. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Substrate wurden die Pherogramme im elektrischen Ofen bei 80°C 30 min. oder in der Luft bei Zimmertemperatur im Abzug getrocknet. Um die Ergebnisse erkennbar zu machen, war neben der Revelation auch die Radioaktivitätsbestimmung notwendig. Hierzu mußten die getrennten Substanzen vom Trägermaterial abgelöst werden. Für eine quantitative Ablösung war der ungefärbte Zustand vorzuziehen. Daher wurden

vom Pherogramm zwei "Pilotstreifen" abgeschnitten und nur diese zusammen mit dem Test- und Vergleichssubstanzen angefärbt.

Zur Revelations wurde verwendet:

- Eine 1 %ige Lösung von Ninhydrin in Aceton als Tauchreagens . Die Lösung wurde für jeden Versuch neu angesetzt, die Farbentwicklung erfolgte durch Erhitzen im elektrischen Ofen bei 105°C .

- Chlorierung und Färbereagens Kaliumjodid/
O-Tolidin

Der Vorteil dieser Färbemethode ist ,daß damit sowohl substituierte Aminosäuren und Peptide als auch höhere Peptide und Proteine zur Darstellung kommen. Die Chlorierung erfolgte in einem dicht schließenden Gefäß, an dessen Boden ein Gemisch von 0,1 n Kaliumpermanganatlösung und 10 %iger Salzsäure unmittelbar vor dem Einbringen des Pherogramms zur Chlorgewinnung gegeben wurde. Der Streifen bleibt 15-20 min. in der Chloratmosphäre und anschließend 3-5 min. an Luft stehen, um den Überschuß an Chlor zu entfernen. Für die Sprühlösung wurden 160 mg O-Tolidin in 30 ml Eisessig gelöst ;

Man füllt aqua dest. auf 500 ml auf und fügt 1 g Kaliumjodid hinzu (20) . Die Färbung erfolgte durch Besprühen. Färbung durch Eintauchen in die Lösung empfahl sich nicht, dann besonders bei starken Fraktionen traten Verwaschungen auf.

Die auf dem Pilotstreifen durch Anfärbung dargestellten Fraktionen wurden auf den ungefärbten Papierteil übertragen. Die mögliche Fehlerquelle , daß auf den ungefärbten Streifen sich die Fraktion nicht geradlinig fortsetzt, wurde dadurch ausgeschlossen, daß beidseitig vom nicht anzufärbenden Teil des Streifens Pilotstreifen abgetrennt wurden. Die so markierten Fraktionen wurden ausgeschnitten und durch eine sogenannte " chromatographische Kapillarelution " aus dem Papier ausgewaschen.

Zum Eluieren wurde eine Kombination der Verfahren von Dent, Sanger, Tuppy, Levis und Dekker (19) genommen. Das zu eluierende an einem Ende zu einer Spitze zugeschnittene Papier wird zwischen 2 Objektträger gelegt, welche schräg in ein das Lösungsmittel enthaltende Petrischale gestellt wurden. Als Lösungsmittel wurde Puffer nach Soerensen mit pH 7,2 ver-

wendet. Das zugespitzte Papierende ragte frei heraus. Auf diese Weise erfolgte an der Spitze eine ständige Verdunstung des Lösungsmittels, was zur Folge hatte, daß immer neue Elutionsflüssigkeit aus der Petrischale einströmte. Die auszuwaschende Substanz wurde so in die Spitze getrieben und dort konzentriert. Nach 12 Stunden wurde die frei herausragende Spitze nach unten abgeknickt, sodaß die konzentrierte Substanz mit einem Minimum an Lösungsmittel völlig ausgewaschen wurde, 0,2ml Eluat reichten zur Radioaktivitätsbestimmung im Scintillationszähler aus. Die Zählergebnisse waren jedoch nicht reproduzierbar.

- 2.11.2. Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G :
- Wegen der Schwierigkeit und Ungenauigkeit, die Radioaktivität von den auf dem Pherogramm gewonnenen Fraktionen zu bestimmen, wurden auch mit der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G Trennungen durchgeführt. Anlaß dazu gaben die Vorteile der Dünnschichtchromatographie:
- daß sich die Substanz geringer ausbreitet, sowohl beim Auftragen der Lösung am Start wie auch während der Chromatographie (21)
 - daß die zur Scintillationszählung benützten Scintillationslösungen als Elutions-

mittel der Fraktionen vom Kieselgel geeignet sind. (22).

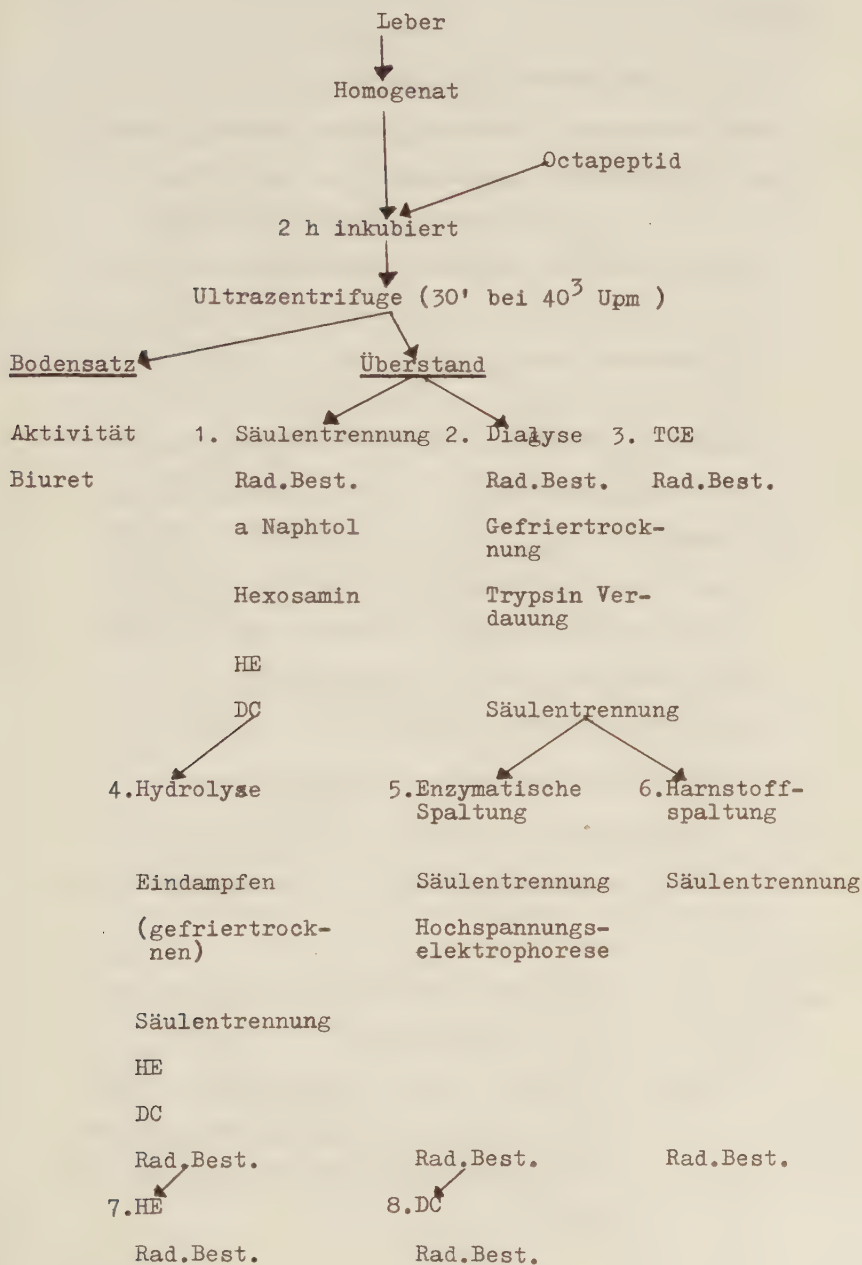
Als Sorptionsmittel wurde Kieselgel G nach Stahl der Firma Merck verwendet, das je nach Trocknungsart Quellungs- und Solvatwasser enthält und daher hervorragende Eignung für die Chromatographie von Aminosäuren besitzt. (21)

Das Aufbringen der Trennschicht auf Trägerscheiben wurde nach Laborangaben mit einem Dünnschichtstreichgerät der Firma Desaga, Heidelberg, durchgeführt.

Im Gegensatz zur allgemeinen Vorschrift wurden die Platten über Nacht an der Luft getrocknet, was sich als Vorteil zur Trennung wässriger Lösungen erwies. Als Fließmittel fand Chloroform-Metanol-17%-ige Ammoniaklösung (in ml 40 + 40 + 20) Verwendung. Die Chromatographie geschah nach Anweisung von M. Brenner, A. Niederwieser und G. Pataki (21) .

Die Revelation der Trennergebnisse erfolgte mit - Ninhydrinreagens und - Chlor/Tolilin-Test. Gerade die Kombination beider Nachweistechiken war besonders vorteilhaft. Vor der Chlorierung mußten die durch das Ninhydrinreagens angefärbten Fraktionen markiert werden. Die zur Radioaktivitätsbestimmung verwendete Lösung nach Bray war hier auch als Elutionsmittel geeignet.

Nach Abschaben der markierten Fraktionen von der Trägerscheibe wurden 2 ml Bray-Lösung zugegeben, zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Nach nochmaligem Auswaschen des Bodensatzes mit 2 ml Bray-Lösung und Zentrifugieren wurde der gesammelte Überstand mit 1 ml Bray-Lösung auf 5ml aufgefüllt und in den Scintillationszähler zur Radioaktivitätsbestimmung gegeben. Um Niederschläge in der Scintillationslösung zu vermeiden, wurde bei $+ 10^{\circ} \text{ C}$ gemessen.



Ergebnisse:

1. Säulenchromatographische Trennung:

Nach Auftrennung der verschiedenen Substanzlösungen in den Chromatographiersäulen wurden das Auftreten und die relative Konzentration der einzelnen Fraktionen über das Durchflußphotometer am automatischen Schreibgerät festgehalten. Aus Zeit- und Durchlaufgeschwindigkeit ließ sich das Elutionsvolumen errechnen. Von jeder Fraktion mit bekanntem Elutionsvolumen wurden 0,2 ml zur Radioaktivitätsmessung gegeben. Die Radioaktivitätswerte konnten so der Substanzkurve und dem Elutionsvolumen zugeordnet werden. Für die hier angestellten Untersuchungen war als Ergebnis der Säulenchromatographie das wechselnde Elutionsvolumen von Substanz und Radioaktivitätsmaximum anzusehen.

Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen:

1.1. an Sephadex G 25 fine und 30 cm langer Säule
mit markiertem Oktapeptid und markiertem Tetrapeptid

1.1.1. in 0,5 ml Phosphatpuffer nach Soerensen
mit ph 7,2 gelöst.

Oktapeptid: $E_{tm} = 108 \text{ min.} \rightarrow E_{vm} 29,16 \text{ ml}$

Tetrapeptid: $E_{tm} = 165 \text{ min.} \rightarrow E_{vm} 44,55 \text{ ml}$

Substanzmaximum entspricht dem Impulsmaximum (Abb.I.)

1.1.2. in 0,5 ml Überstand (nicht inkubiert, nach Mischen sofort auf die Säule)

1. Maximum der Substanzkurve (-- Proteine)

$$E_{tm} = 36,6 \text{ min.} \rightarrow E_{vm} 9,9 \text{ ml}$$

1. Radioaktivitätsmaximum (-- Oktapeptid)

$$E_{tm} = 75 \text{ min.} \rightarrow E_{vm} 20,1 \text{ ml}$$

2. Radioaktivitätsmaximum (-- Tetrapeptid)

$$E_{tm} = 170 \text{ min.} \rightarrow E_{vm} 45,9 \text{ ml}$$

Abb.II

1.2. Homogenat und Oktapeptid wurden inkubiert, 0,5ml des Überstandes nach Ultrazentrifugation werden auf G 25/30 gegeben.

$$E_{tm} \text{ Protein} = 36,6 \text{ min.} \rightarrow E_{vm} \text{ Protein} = 9,9 \text{ ml}$$

$$E_{tm} \text{ Ipm} = 71 \text{ min.} \rightarrow E_{vm} \text{ Ipm} = 19,17 \text{ ml}$$

$$E_{tm} \text{ Peptid} = 80 \text{ min.} \rightarrow E_{vm} \text{ Peptid} = 21,6 \text{ ml}$$

Abb.III

1.3. nach Harnstoffdenaturierung

Die Denaturierung des Überstandes erfolgte bei ph 7,2, 4,0 und 9,8. Die ph-Werteinstellung von 4,0 und 9,0 wurde durch Zugabe von 1 n HCl, bzw. 1n NaOH zu 1 ml Überstand mit ph 7,2 erreicht. Nach dem Lösen der verschiedenen Harnstoffmengen wurden je 0,5 ml der Lösungen säulenchromatographisch getrennt und von den einzelnen Fraktionen die Impulswerte bestimmt.

$$E_{tm} \text{ Protein} = 36,6 \text{ min.} \rightarrow E_{vm} \text{ Protein von } 9,9 \text{ ml}$$

$$E_{tm} \text{ Ipm} = 71 \text{ min.} \rightarrow E_{vm} \text{ Ipm} = 19,17 \text{ ml}$$

Diese Werte traten bei allen Molaritäten des Harnstoffs und bei den verschiedenen ph-Werten identisch auf. Sie entsprachen auch den Trennergebnissen des Ausgangsmaterials. Nur die Elutionszeit des Peptidpic's variierte.

Die Mittelwerte ergaben:

Bei ph 4 $E_{tm} \text{ Peptid} = 87 \text{ min} \rightarrow E_{vm} \text{ Peptid} = 23,5 \text{ ml}$

Bei ph 7,2 $E_{tm} \text{ Peptid} = 85 \text{ min} \rightarrow E_{vm} \text{ Peptid} = 22,9 \text{ ml}$

Bei ph 9 $E_{tm} \text{ Peptid} = 81 \text{ min} \rightarrow E_{vm} \text{ Peptid} = 21,9 \text{ ml}$

Abb.IV

1.4. nach enzymatischer Spaltung

1.4.1. Verdauung durch Trypsin

Als Ausgangsmaterial wurde 20,0 mg Lyophilisat in 2 ml Puffer nach Soerensen mit ph 7,4 gelöst. 1 ml Trockensubstanzlösung als Vergleichstrennung und 1 ml Verdauungsansatzlösung wurden auf Sephadex G 25 mit 30 cm langer Säule und auf Sephadex G 15 fine mit 60 cm langer Säule chromatographiert.

G 25/30 :

$E_{tm} \text{ Ipm} = 71 \text{ min} \rightarrow E_{pm} = 19,17 \text{ ml}$

$E_{tm} \text{ Peptid} = 80,3 \text{ min} \rightarrow E_{vm} \text{ Peptid} = 21,6 \text{ ml}$

Diese Werte waren bei den Auftrennungen identisch und entsprachen den Werten der Auftrennung des gesamten Überstandes.

G 15/60 :

$$E_{tm}Ipm = 120 \quad E_{vm}Ipm = 32,4 \text{ ml}$$

$$E_{tm}Peptid \ 1 = 143 \text{ min.} \rightarrow E_{vm}Peptid \ 1 = 38,7 \text{ ml}$$

$$E_{tm}Peptid = 163 \text{ min.} \rightarrow E_{vm}Peptid \ 2 = 44,01 \text{ ml}$$

Aus der Vergleichstrennung ergaben sich :

$$E_{tm}Peptid \ 1 = 140 \text{ min.} \rightarrow E_{vm}Peptid \ 1 = 37,8 \text{ ml}$$

$$E_{tm}Peptid \ 2 = 160 \text{ min.} \rightarrow E_{vm}Peptid \ 2 = 43,2 \text{ ml}$$

$E_{tm}Ipm$ und $E_{vm}Ipm$ blieben identisch. Die Substanzkurven zeigten 2 Maxima, die sich durch den Verdauungsansatz zu höheren E_{tm} bzw. E_{vm} -Werten verschoben.

Abb.V

1.4.2. Verdauung durch Pepsin

Von 1 ml Überstand und 1 ml Pepsinlösung wurden je 0,5 ml chromatographisch getrennt.

1.4.2.1. Auf Sephadex G 25 fine mit 30 cm langer Säule

$$E_{tm}Ipm = 71 \text{ min.} \rightarrow E_{vm}Ipm = 19,17 \text{ ml}$$

(Diese Werte entsprachen der Überstandtrennung)

Die Substanzkurve zeigte keine ausgeprägten

Maxima mehr, vor allem das Proteinmaximum wurde geringer und zu den Peptiden verschoben.

Abb. VI

1.4.2.2. Auf Sephadex G 15 fine mit 30 cm langer Säule

$$E_{tm}Ipm = 100 \text{ min.} \rightarrow E_{vm}Ipm = 27 \text{ ml}$$

Die 4 pics zeigten eine deutliche Auftrennung der Substrate.

Abb. VII

1.4.2.3. Auf Sephadex G 15 fine mit 60 cm langer Säule

$$E_{tm}Ipm = 120 \text{ min.} \rightarrow E_{vm}Ipm = 32,4 \text{ ml}$$

Die Auftrennung der Substanz in 4 pics blieb erhalten.

Abb. VIII

Eine Änderung des Elutionsvolumens für die Fraktion mit maximaler Ipm war durch den Verdauungsansatz nicht eingetreten. Im Substratgemisch trat eine Verschiebung der großmolekularen Substanzen zu den niedrigeremolekularen Strukturen auf. Die Zuordnung zum Radioaktivitätsmaximum war bei den verschiedenen Perlgrößen des Sephadex und bei den 2 Säulenlängen erkennbar.

1.5. Nach Säurehydrolyse des Überstandes

0,5 ml des konzentrierten Hydrolysats (nach Eindampfen und Lösen in 1,5 ml Aqua dest.) wurden auf Sephadex G 25 fine und 30 cm Säulenlänge getrennt.

$$E_{tm} Ipm = 175,6 \text{ min.} \rightarrow E_{vm} Ipm = 48 \text{ ml}$$

Es war eine Totalhydrolyse der Proteine und Peptide eingetreten. Die Substanzmaxima liegen im Bereich der Aminosäuren.

Ab. IX

2. Ergebnisse des Flächenvergleiches der graphischen Darstellungen von Substratkurve ohne Inkubation und mit Inkubation nach der Säulenchromatographie.

Zur näherungsweisen Berechnung ebener Flächen wurde die Simpson'sche Regel genommen (23)

$$F = \frac{b-a}{6 \cdot n} \quad CC \quad y_0 + y_{2n}) + 4 (y_1 + y_3 + \dots + y_{2n-1}) \\ + 2 (y_2 + y_4 + \dots + y_{2n-2})) \quad (23)$$

$F_{\text{Protein}} = 14,3 \text{ cm}^2$ (ohne Inkubation und mit Inkubation)

$F_{\text{Peptid}} = 18,23 \text{ cm}^2$ (ohne Inkubation)

$F_{\text{Peptid}} = 18,12 \text{ cm}^2$ (mit Inkubation)

Abb. X

1.3. Ergebnisse der Radioaktivitätsbestimmungen des Bodensatzes und des Überstandes.

Nach 2 Std. Inkubieren im Warburg-Gerät wurde das Homogenat 30 min. bei 0°C und 40 000 Umdrehungen pro min. in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

Nach Abgießen des Überstandes wurde der Bodensatz mit 5,0 ml isotonischer Kochsalzlösung aufgeschlämmt. Mit je 0,2 ml Bodensatzlösung und Überstand wurde die Biuretreaktion zur Gesamteiweißbestimmung durchgeführt.

0,2 ml Überstand (Mittelwert) 0,855 g%

0,2 ml Bodensatz (Mittelwert) 1,29 g%

Die Impulsrate von 0,2 ml Überstand wurde in Bray-Scintillations-Lösung mit dem Scintillationszähler mit Quenchberechnung bestimmt.

Ipm/0,2 ml Überstand = 31 426

Die Impulsbestimmung von 0,2 ml Bodensatzlösung erfolgte in Hyamin- Toluol- Scintillationslösung (mit Quench-Bestimmung).

Ipm/0,2 ml Bodensatz = 2 310

Auf 1 g Leberfrsichgewicht bezogen ergab das eine Impulsverteilung:

Überstand	Bodensatz
1. 89 000 Ipm	106. 200 Ipm

Abb. XI

4. Ergebnisse weiterer Untersuchungen des ultrazentrifugierten

Überstandes.

4.1. Eiweißfällung mit Trichloressigsäure

Nach Abtrennung des Fällungs-niederschlagcs durch Zentrifugieren wurden vom Überstand TCE in Bray-Scintillationslösung und vom Bodensatz TCE in Hyamin-Toluol-Scintillationslösung die Impulswerte mit Quenchberechnung bestimmt.

0,2 ml Überstand TCE = 12. 152 Ipm

0,2 ml Bodensatz TCE " 50 Ipm

Auf 1 g Leber bezogen ergab das einen Impulswert von

1. 581. 760 Ipm für den Überstand TCE ,

7. 800 Ipm für den Bodensatz TCE .

Abb. XI

4.2. Dialyse des Überstandes

Während der Dialyse kam es zur Gewichtszunahme des Dialysesackinhalts von 2,5 g auf 2,98 g ; eine Radioaktivität konnte nicht festgestellt werden. Nach Gefriertrocknung der Dialyseflüssigkeit wurden vom Lyophilisat 20 mg in 2 ml Puffer nach Soerensen mit ph 7,2 gelöst. 0,2 ml Lösung ergaben mit Quenchbestimmung eine Impulsrate von 12. 205. Dieser Wert entsprach annähernd dem Impulswert des Überstandes aus der Trichloressigsäurefällung.

Auf 1 g Leber bezogen ergab das 1. 601. 300 Ipm (dieser Wert wurde im Verhältnis zur Trichloressigsäurebestimmung berechnet).

5. Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen von Kohlehydraten und Mucoiden.

Abb. XI

Die durch die Säulenchromatographie gewonnenen Fraktionen mit bekannten Impulswerten wurden zur Hexosaminbestimmung nach Blix und zur Pentosen- und Hexosenbestimmung mit der α -Naphthol- Schwefelsäure- Reaktion verwendet.

1. Hexosaminbestimmung

Die Konzentrationen waren so niedrig, daß eine quantitative Erfassung, vor allem aber die Zuordnung zum Radioaktivitätsmaximum, nicht möglich war.

2. Pentosen-und Hexosenbestimmung

E_t Zucker = 63,4 min. $\rightarrow E_v$ Zucker = 17,12 ml.

Eine Übereinstimmung der Pentosen- und Hexosenmaxima mit dem Radioaktivitätsmaximum war nicht gegeben.

Abb. XII

6. Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen mit der Hochspannungselektrophorese:

6.1. Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit vom pH-Wert der Pufferlösungen bei 8 Kilovolt und 2 Stunden Laufzeit.

pH-Wert Laufstrecke in cm der radioaktiven Fraktion

	Octapeptid	Überstand
1,9	8	16
3,6	10,5	0,5

Die radioaktivitätstragende Fraktion des Überstandes lag bei pH 3,6, sodaß eine nahe der Auftragsstelle quantitative Erfassung nicht möglich war. Wegen der besseren Trennergebnisse, vor allem des Überstandes, wurden weitere elektrophoretische Auftrennungen beim pH 1,9 durchgeführt.

- 6.2. Laufstrecken der die Radioaktivität tragenden Fraktionen bei pH 1,9; 8 Kilovolt und 2 Stunden Laufzeit in cm:

Octapeptid	Überstand	Frakt.Ü.	Frakt.Ü. Pepsin	Hydrolysat
8	17,5	17,5	17	32

(Abb. XIII und XIV)

- 6.3. Die Zuordnung der radioaktiven Fraktionen zu den Standardlösungen I und II mit bekannten Aminosäuren war nur bei der elektrophoretischen Auftrennung des Hydrolysates möglich.

Laufstrecke in cm :

Hydrolysat	Fraktion	Glycin	Standard II
	32		32

(Abb. XIII)

7. Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen mit der Dünnschichtchromatographie:

Mit der Dünnschichtchromatographie wurden die Ergebnisse der Hochspannungselektrophorese überprüft, da durch die niedrigen Zählausbeutungen nach der chromatographischen Kapillarellution Fehlerquellen gegeben waren. Die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie bestätigten die Resultate der Hochspannungselektrophorese. Die Zuordnung der einzelnen radioaktivitätstragenden Fraktionen blieb gleich.

(Abb. XV)

Abbildung I

0,5 ml

aus 1 ml Puffer+0,2 ml Oct.+ 0,2 ml Tetra
auf G 25/30

Durchlaufgeschw. 16 ml/h

— Substanzkurve

---- Radioaktivitätskurve

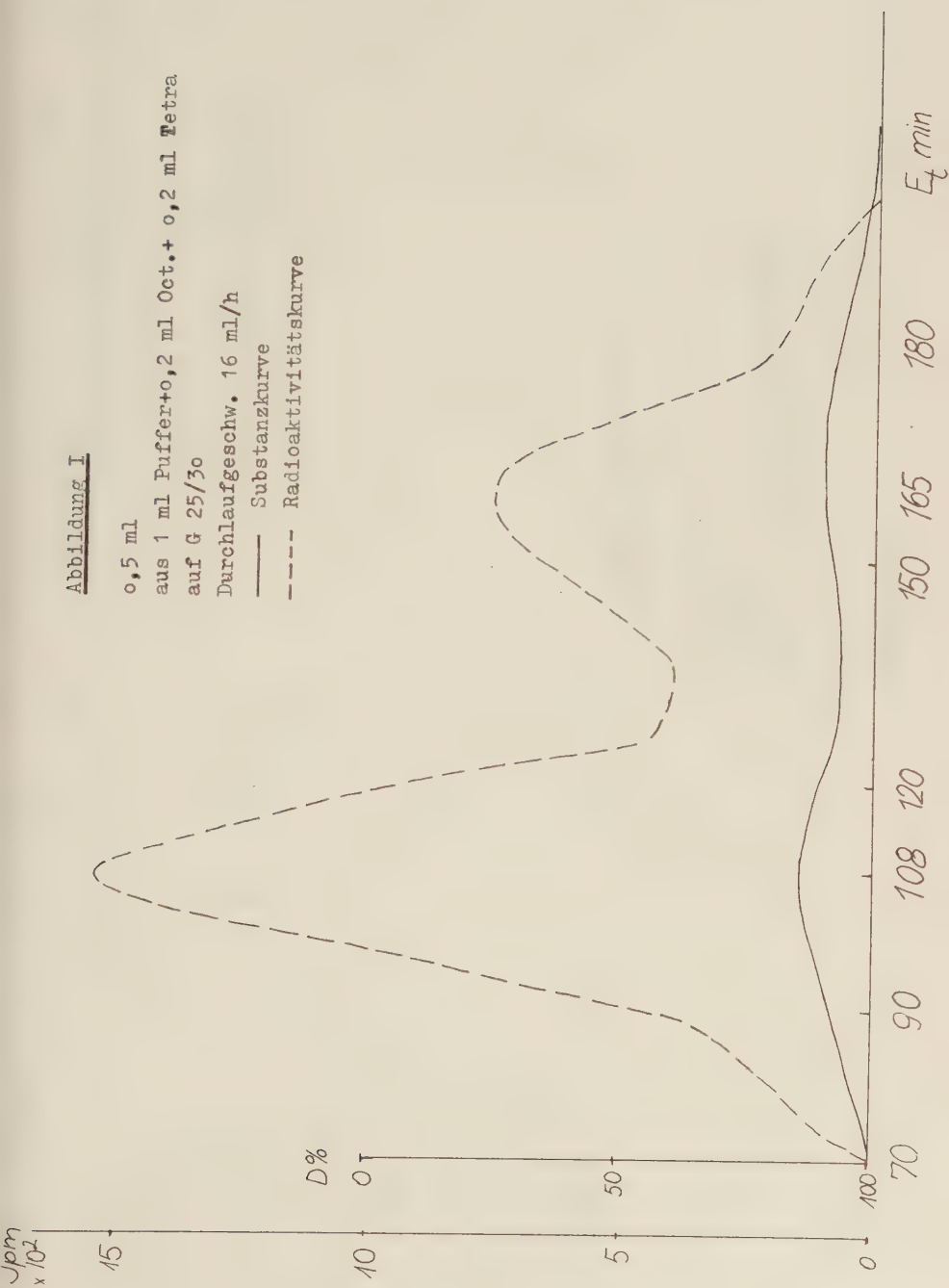


Abbildung II

0,5 ml Ü (nicht inkubiert)
 + 0,05 ml Oct. u. 0,05ml Tetrapeptid
 auf 25/30
 Durchlaufgeschw. 16 ml/h

— Substanzkurve
 ---- Radioaktivitätskurve

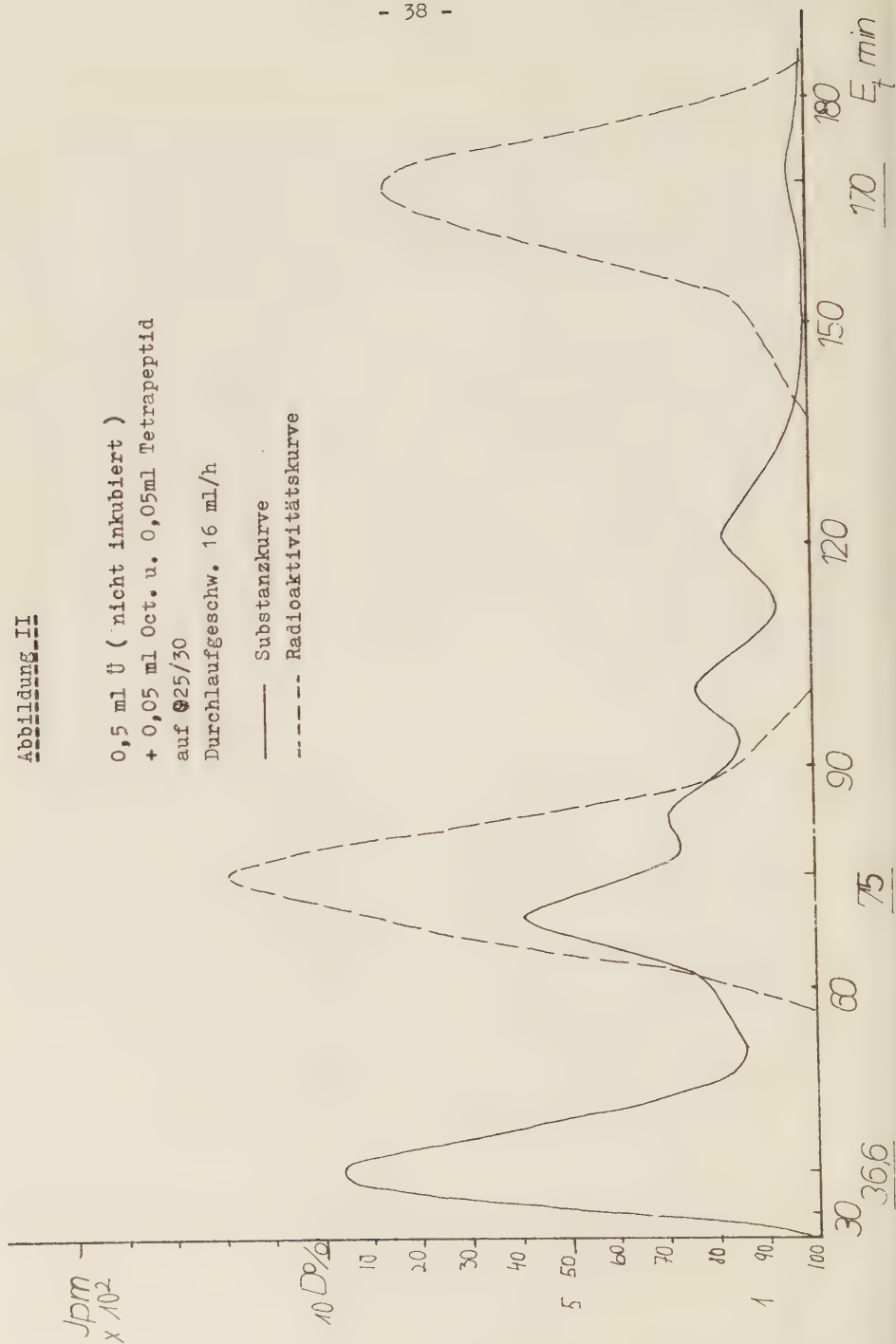


Abbildung III

0,5 ml Überstand
auf Q25/30
Durchlaufgeschw. 16 ml/h
Impulsweite mit Quenchbestimmung

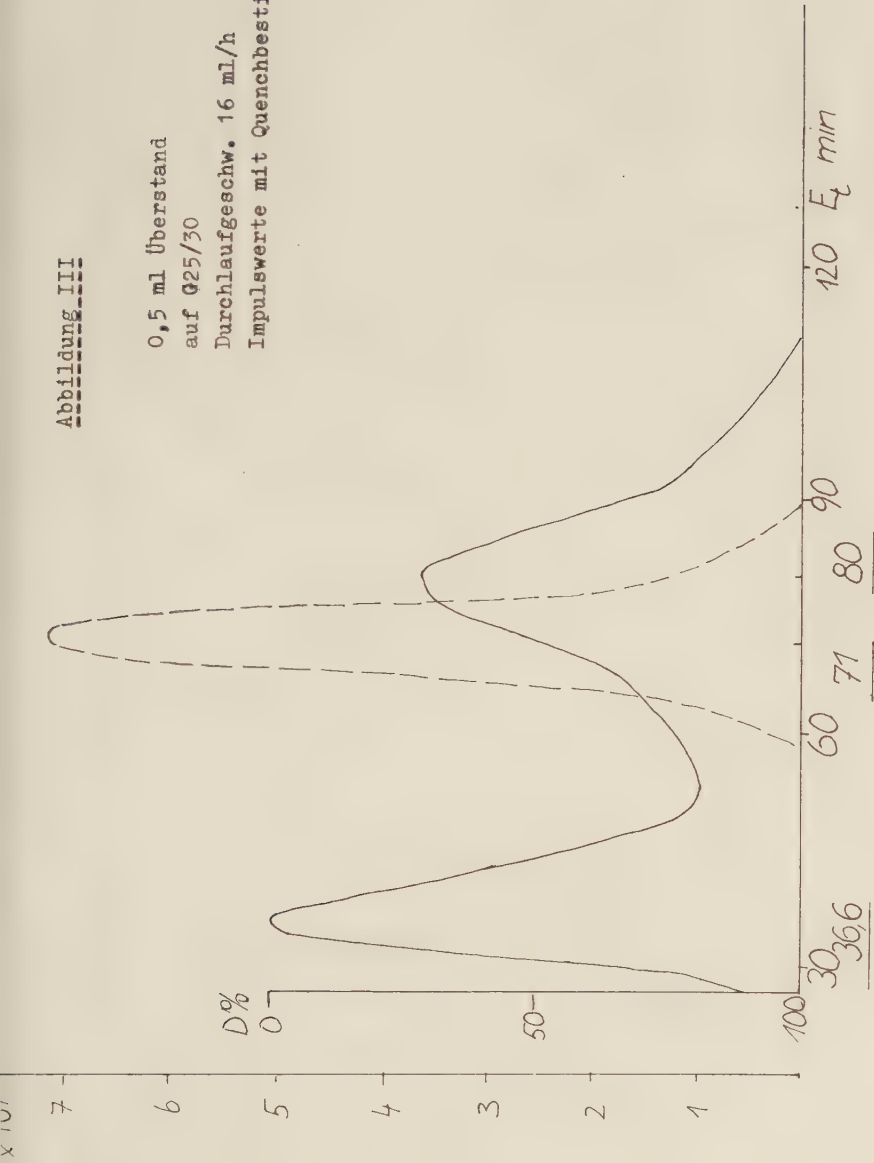


Abbildung IV

Veränderung des E_v Peptid bei
Harnstoffdenaturierung

J_{pm}
 $\times 10^4$

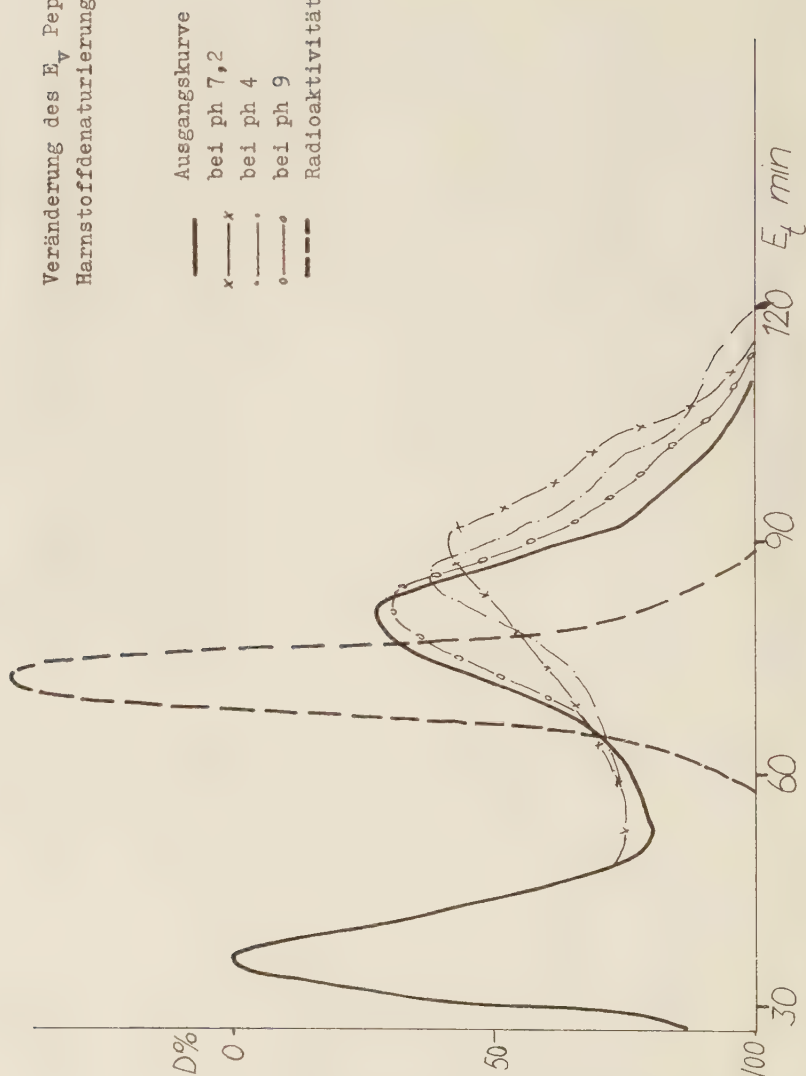


Abbildung V

— Vergleichskurve
0,25 ml aus 20 mg Trockensubstanz + 2 ml Puffer
— Verdauungskurve
0,5 ml von 1 ml Trockensubst.-
lsg. + 1 ml Trypsinlsg.
3 h inkubiert

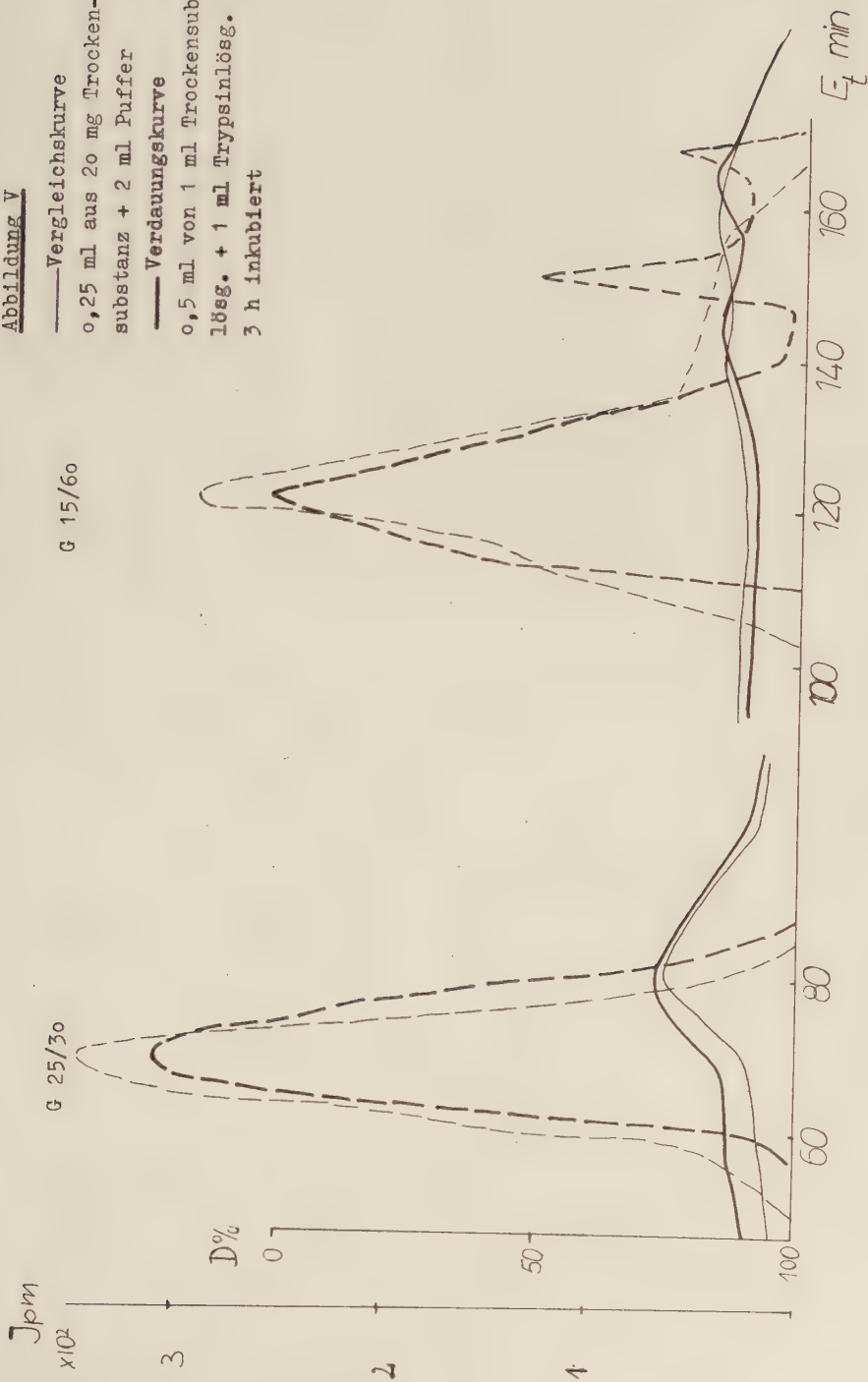


Abbildung VI

auf G25/30
Durchlaufgeschw. 16 ml/h
Vergleichskurve
— 0,5 ml Überstand (5 ml Hom + 1 ml Oct.)
mit Radioaktivitätskurve
— 0,5 ml nach Pepsinverdauung (3h inkubiert)
(1 ml U + 1 ml Pepsinlösung)
mit Aktivitätskurve

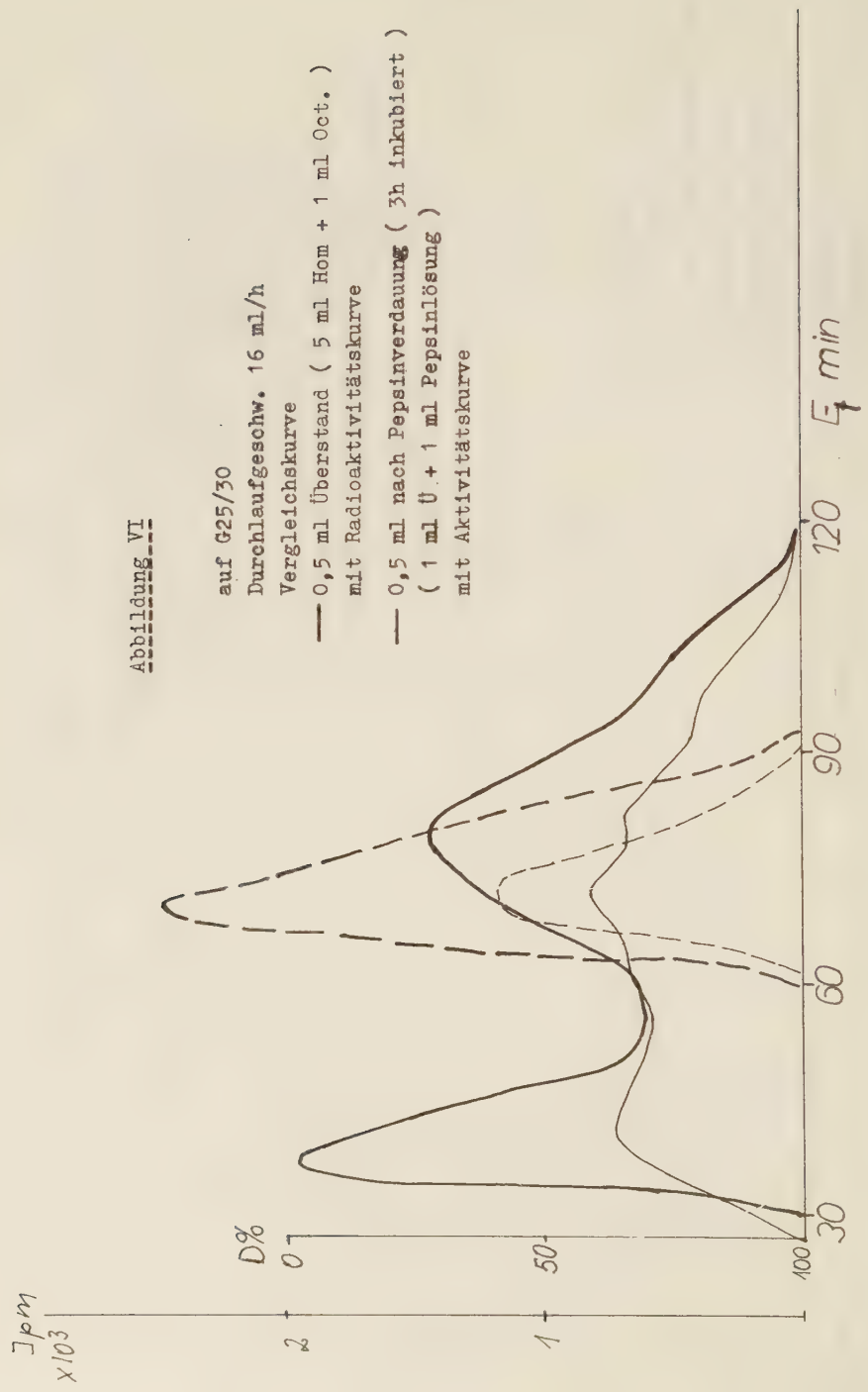


Abbildung VII

1 ml aus 1 ml Überstand
+ 1 ml Pepsinlösung (3h inkubiert)
auf G15/30

— Substanzkurve
--- Radioaktivitätskurve

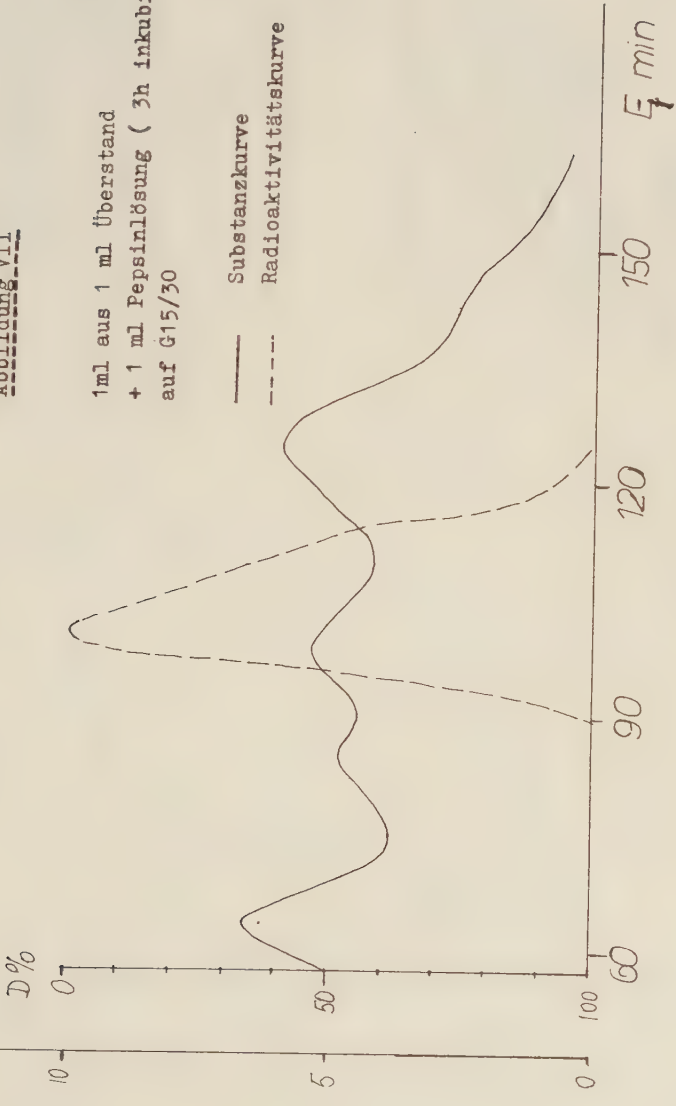


Abbildung VIII

auf G15/60

— 0,5 ml Überstand
als Vergleichskurve

— 1 ml aus 1 ml Überstand
+ 1 ml Pepsinlösung (3h inkubiert)

Radioaktivitätskurven sind identisch

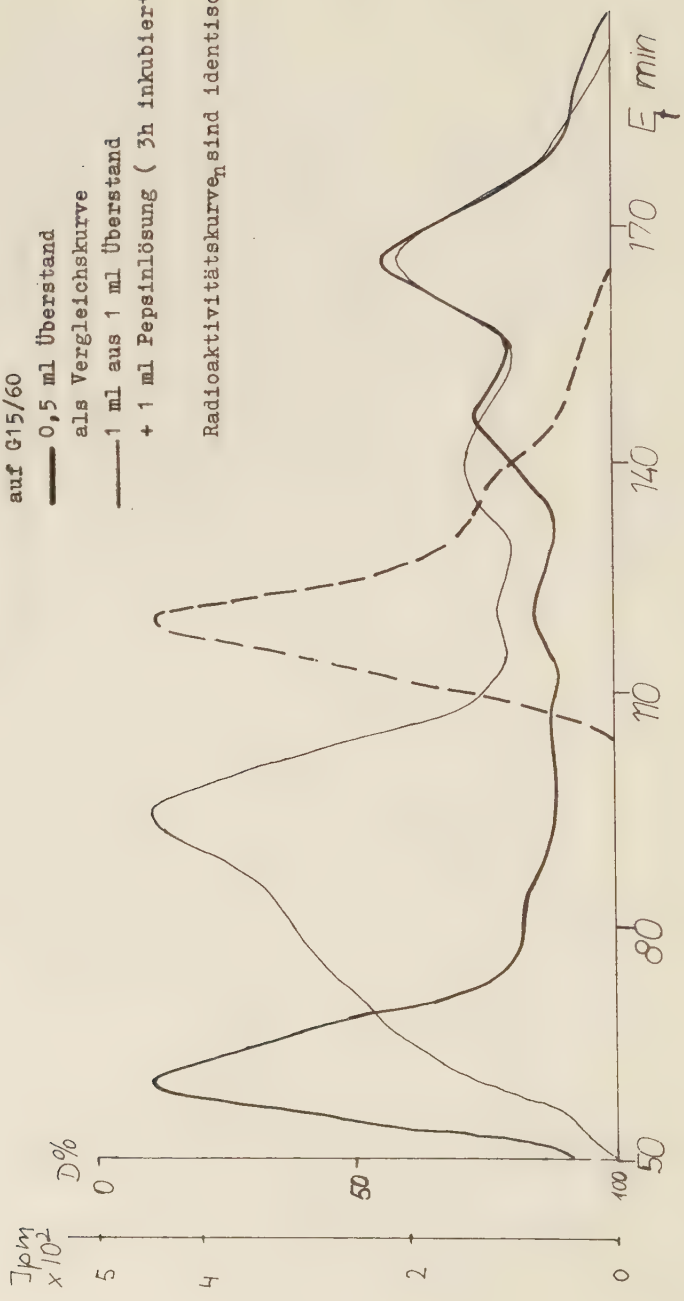


Abbildung IX

0,5 ml auf G 25/30
aus 2 ml U, 16 h mit 100 ml HCl
hydrolisiert, eingedampft und in
1,5 ml Puffer gelöst;

— Substanzkurve
---- Radioaktivitätskurve

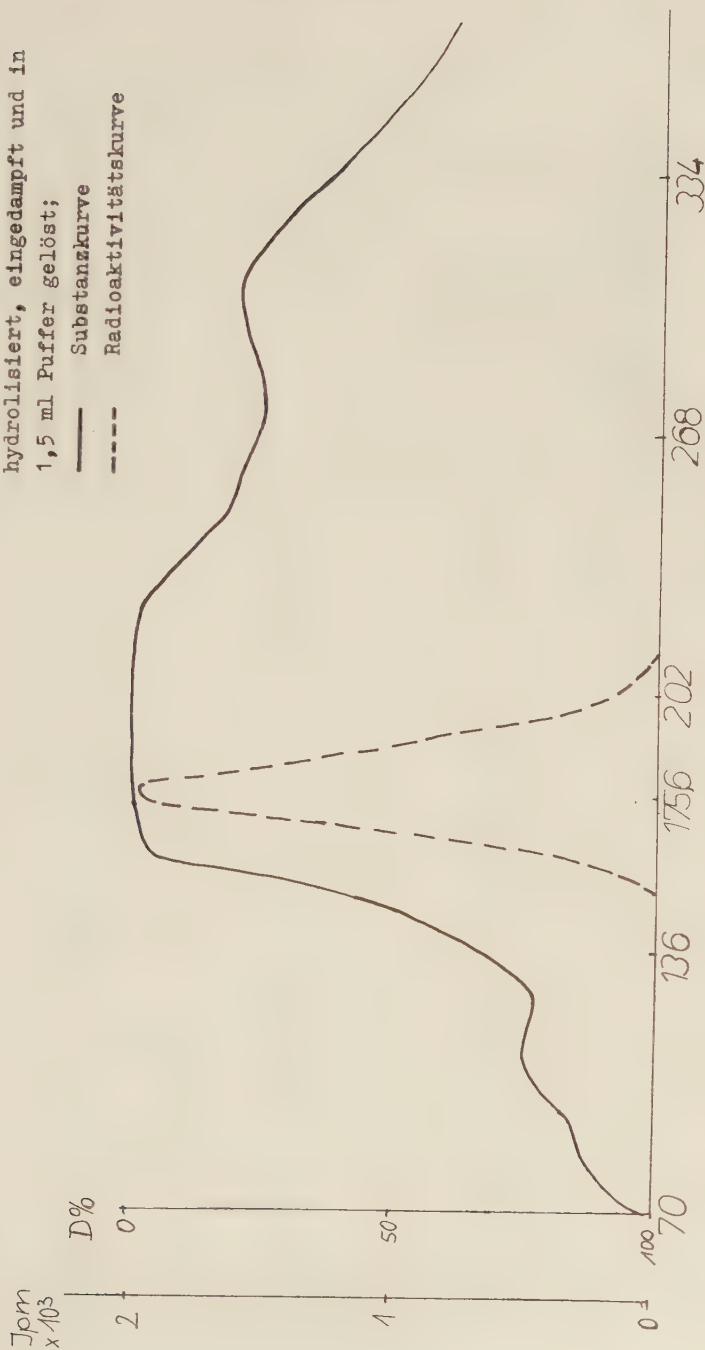


Abbildung X

----- Substanzkurve ohne Inkubieren
----- Substanzkurve mit Inkubieren



Abb. XI

Impulswerte pro mg Leberfrischgewicht in



Abbildung XII

0,5 ml Überstand auf G 25/30

Substanzkurve

Radioaktivitätskurve

Pentosen (bei 550 mμ)

Hexosen (bei 570 mμ)

Hexosamine

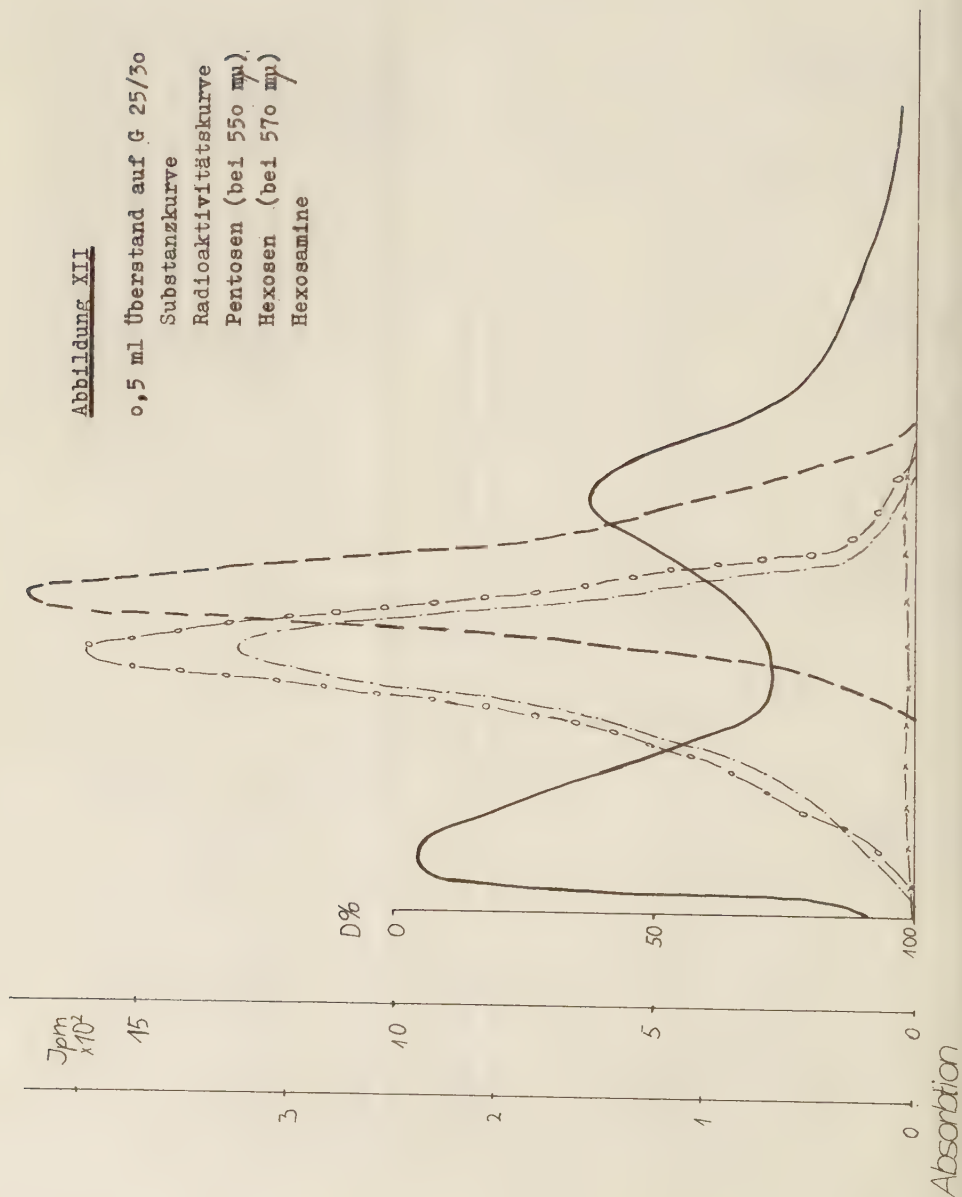


Abb. XIII

Hochspannungselektrophorese, Laufzeit 2 h, KV 8, pH 1,9
(maßstabsgetreue verkürzte, schematische Zeichnung)

 Radioaktiv markierte Fraktion

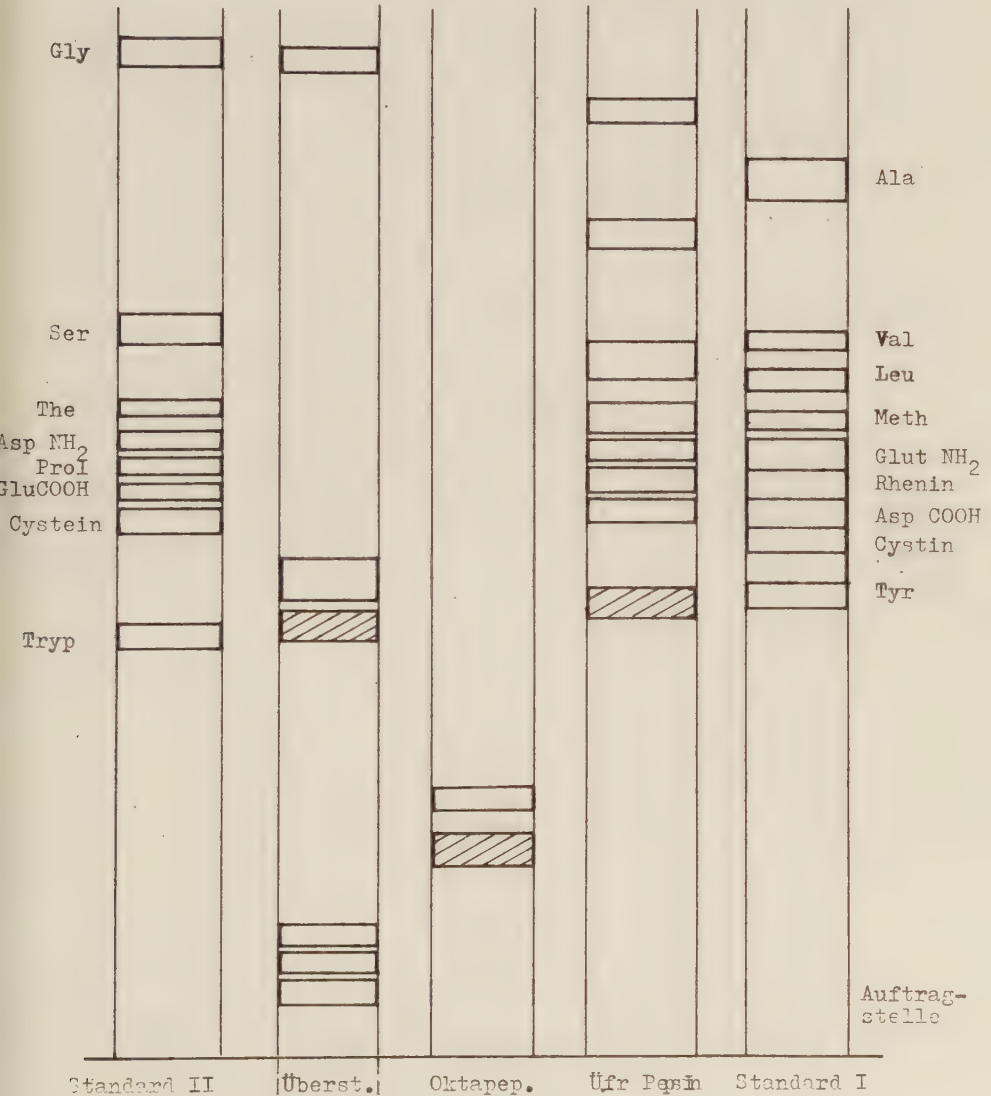


Abb. XIV

Hochspannungselektrophorese
(wie Abb. XIII)

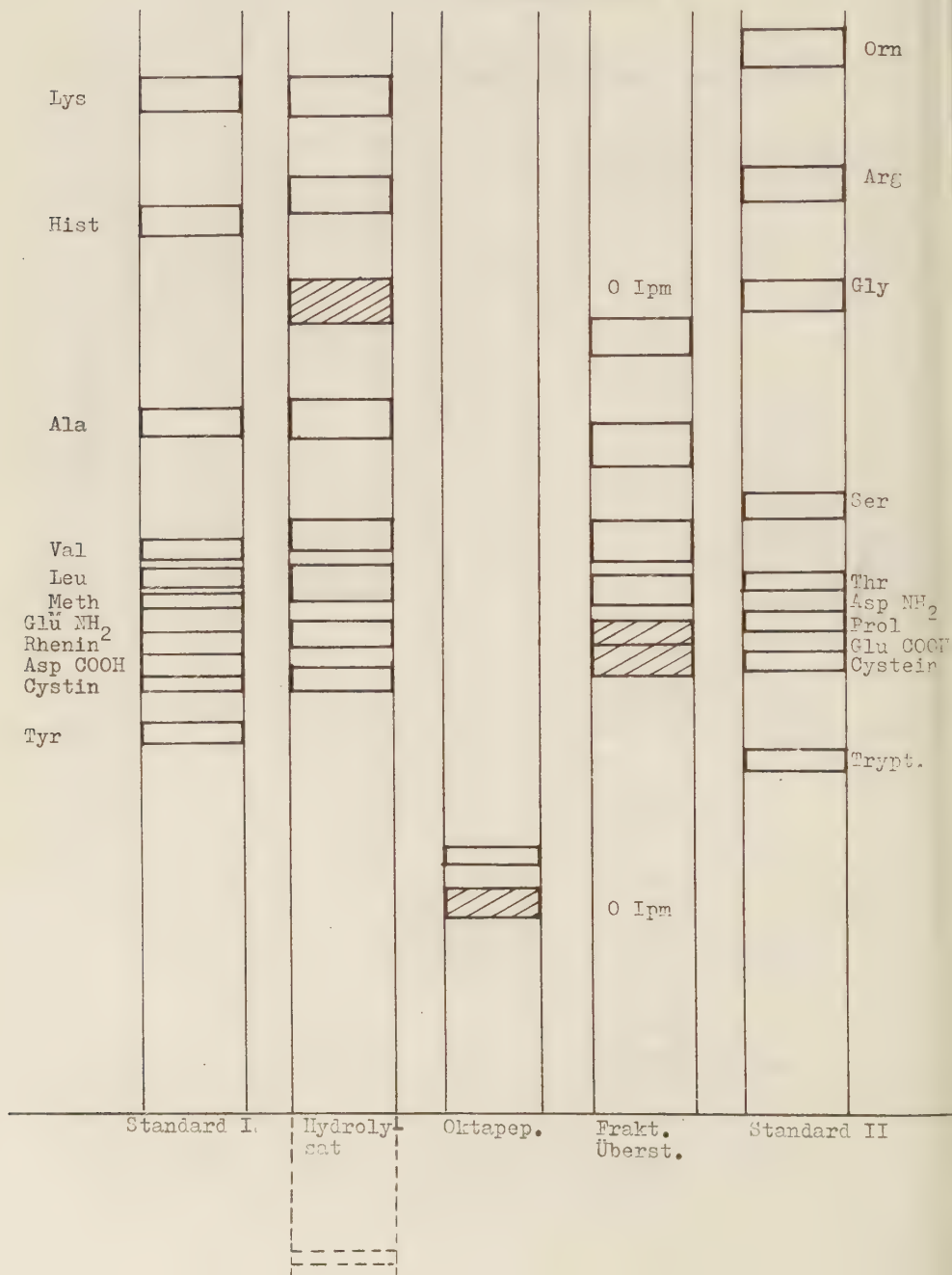


Abb. XV

DC auf Kiesel Gel G

Laufmittel : Chloroform : Methanol: Ammoniak

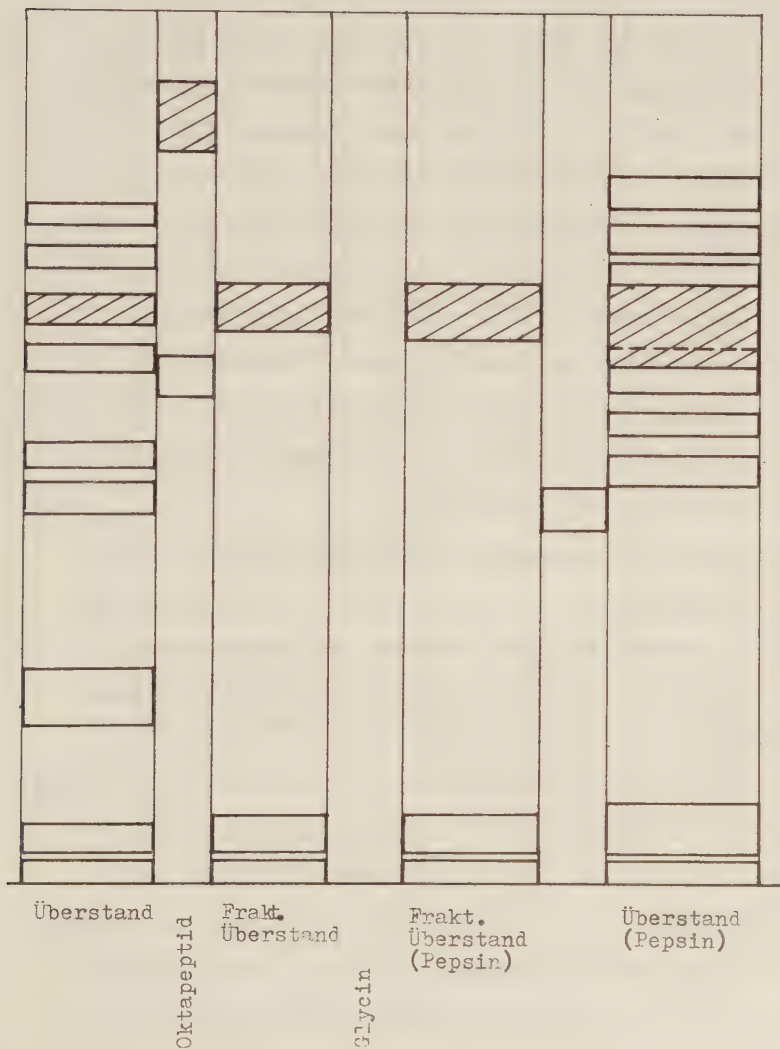
Laufzeit : 2 h

Färbung : 1. Ninhydrin

2. Chlorierung + Tolidin



Radioaktiv markierte Fraktion



Diskussion :

Durch die Untersuchungen von R.F. Lick und Mitarbeiter wurde gezeigt, daß bei intraportaler Injektion Gastrin eine ungehinderte sekretorische Aktivität besitzt, dagegen das synthetische C-terminale Tetrapeptid in der Leber eine partielle Inaktivierung erfährt. Aus dem Konzentrationsmaximum des radioaktiv markierten Oktapeptids in der Leber bei Ratten ist entweder eine Speicherung, mehr wahrscheinlich aber die Metabolisierung in diesem Organ anzunehmen. Da jedoch das ganze Gastrinmolekül nach intraportaler Injektion noch volle Aktivität besitzt, muß gefolgert werden, daß es entweder in der Leber nicht abgebaut wird, oder aber eine Teilmetabolisierung erfährt, wobei die C-terminale Tetrapeptidstruktur erhalten bleibt. Erst bei weiteren Leberpassagen erfolgt die Inaktivierung des Tetrapeptids.

Die Verfolgung des radioaktiv markierten Oktapeptids in in-vitro-Versuchen wurde so durchgeführt, daß die physiologischen Systeme der Leber während der Inkubationszeit noch voll aktiv waren. Die Ergebnisse der Versuche lassen schließen:

1. Das radioaktiv markierte Oktapeptid liegt nicht im freien, ungebundenen Zustand während der Leberpassage vor.

Das Elutionsvolumen des Oktapeptids bei der Säulenchromatographie ist nach dem Inkubieren um 10 ml geringer als es dem freien Oktapeptid zukommt. Jedoch auch ohne Inkubieren ist schon eine Verringerung des Elutionsvolu-

mens eingetreten. Im γ -Leberhomogenat erfolgte somit eine sofortige Änderung der Molekülgröße, die mit der maximalen Radioaktivität verbunden ist. Auch die Dünnschichtchromatographie und die Hochspannungselektrophorese bestätigen dieses Resultat.

2. Ein Einbau des gastrinspezifischen Oktapeptids in die Zellen des Leberparenchyms ist nicht anzunehmen. Durch die Abtrennung der corpuskulären Bestandteile in der Ultrazentrifuge konnte die Radioaktivität im Bodensatz nur in so geringem Maße nachgewiesen werden, daß eine weitere Verfolgung für die Metabolisierung des Oktapeptids in den corpuskulären Strukturen der Leber nicht notwendig war.
3. Es tritt keine Verbindung mit Eiweißkörpern ein. Sowohl die Dialyse, die Trichloressigsäurefällung als auch die Säulenchromatographie zeigten, daß in den großmolekularen Proteinstrukturen keine radioaktiven Substanzen eingebaut werden.
4. Die Ergebnisse der Säulenchromatographie zeigen sehr deutlich, daß das Schicksal des markierten Oktapeptids an niedermolekulare Substanzen gebunden ist. Jedoch tritt das Radioaktivitätsmaximum immer vor dem Maximum der niedermolekularen Substanz auf.

5. Zeigt das Leberhomogenat im niedermolekularen Bereich vor dem Inkubieren 4 Substanzgemische mit unterschiedlichen Molekulargewichten, was im Säulenchromatogramm durch die 4 Maxima mit verschiedenen Elutionsvolumina bewiesen wurde, so ist nach dem Inkubieren nur ein Substanzgemisch mit einem Maximum zu finden. Der Flächenvergleich der Chromatogramme erbrachte, daß es zu keiner Substanzab- und Zunahme kam. Durch den biochemischen Prozeß während des Inkubierens änderte sich der Substrataufbau im niedermolekularen Bereich. Auch das der maximalen Radioaktivität zugeordnete Molekül erfährt diese Änderung.
6. In der Säulenchromatographischen Auftrennung wurde die Zuordnung des Oktapeptids oder eines die Tritiummarkierung tragenden Metaboliten zu Oligo- und Polipeptiden festgestellt. Sofern diese Zuordnung Wasserstoffbrücken bewirken, mußte erwartet werden, daß das Elutionsvolumen der Fraktion mit maximalen Impulsen nach der Harnstoffdenaturierung geändert ist. Die Harnstoffspaltungen aber ergaben keine Veränderung des Elutionsvolumens, so daß keine Anlagerung über Wasserstoffbrücken zu Oligo- und Polipeptiden nach dem Inkubieren eingetreten ist.

7. Die Bildung peptischer und tryptischer Peptide nach enzymatischer Spaltung brachten keine Änderung des Elutionsvolumens der Fraktion mit maximaler Impulsrate. Die Versuche mit Trypsin wurden mit Trockensubstanz durchgeführt, die aus der Dialyse als niedermolekulare Substanz gewonnen worden war. Die Trennungsprodukte der Proteine treten bei der Enzymspaltung evtl. als Oligo-Peptide im Chromatogramm auf und verwischen so die Ergebnisse der zu erwartenden Peptidtrennung.

Die Pepsinverdauung brachte die Zuordnung eines Substanzmaximums zum Radioaktivitätsmaximum auf den Chromatogrammen. Die Hochspannungselektrophoretische und dünnschichtchromatographische Identifizierung zeigte, daß diese Fraktion auch der Fraktion der säulenchromatographischen Auftrennung des unbehandelten Überstandes entsprach.

8. Auch die Anlagerung des Oktapeptids an Kohlehydrate oder Mucoide wurde untersucht. Die Ergebnisse von Pentosen, Hexosen und Hexosaminen brachten keine Übereinstimmung dieser Substanzmaxima mit dem Radioaktivitätsmaximum. Eine Zuordnung zu dieser Substanzgruppe war nicht eingetreten.
9. Auf der Säulenchromatographie konnten keine Spaltprodukte des Oktapeptids, vor allem nicht der Abbau

zum Tetrapeptid oder zu den Aminosäuren gezeigt werden. Die vergleichenden Untersuchungen mit anderen Oligo-Peptiden, die im Oktapeptid enthalten sind, konnten nicht durchgeführt werden, da die Vergleichssubstanzen vom Hersteller nicht geliefert werden konnten.

Durch die Säurehydrolyse wurde experimentell eine Zerlegung der Eiweiße und Peptide, also auch das Oktapeptids, in die einzelnen Aminosäuren durchgeführt. Die hochspannungselektrophoretische Auftrennung des Hydrolysats bewies die Zuordnung der Radioaktivität tragenden Fraktion zum Glycin, was auch zu erwarten war.

10. Die Hochspannungselektrophorese und Dünnschichtchromatographie zeigte, daß das Tritium markierte Molekül nicht an den Stellen auftritt, wo das freie Oktapeptid liegt.

Diese Erkenntnis ergab sich deutlich bei Vergleichstrennungen von Überstand, fraktionierten Überstand aus der Säulentrennung, Überstand und fraktioniertem Überstand nach Pepsinverdauung und der Trennung des Hydrolysats mit dem Oktapeptid.

Zusammenfassung :

Der Enzymapparat der Rattenleber verändert die Molekülstruktur des gastrinspezifischen Oktapeptids. Durch die radioaktive Markierung konnte das Oktapeptid oder seine Metaboliten in den verschiedenen Versuchen deutlich verfolgt werden.

Das Oktapeptid tritt nach Einwirken des Leberhomogenates in einem anderen Bereich auf, als es dem freien Oktapeptid zukommt (Säulenchromatographie, Hochspannungselektrophorese, Dünnschichtchromatographie). Es ist nicht intrazellulär eingebaut (Ultrazentrifuge) und findet sich im Bereich niedermolekularer Substanzen (Säulenchromatographie, Dialyse, Trichloressigsäurefällung). Es bildet keine Verbindung mit Kohlehydraten und Mucoiden. Auch die Anlagerung an Peptide über Wasserstoffbrücken konnte ausgeschlossen werden.

Das Oktapeptid ist an andere niedermolekulare Strukturen gebunden. Es blieb offen, ob es als ganzes Molekül oder als Spaltprodukt vorliegt. Die Überprüfung dieser Fragen muß bei Untersuchungen mit dem vollständigen Gastrinmolekül geklärt werden.

Literaturverzeichnis:

1. Lick, Rainer, F. unter Mitarbeit von Dieter Balser,
Die Geschichte der angewandten Magenphysiologie, München,
August 1967
2. Medical Tribune Nr. B47 1970 ,3
3. Medical Tribune Nr. 14 1971 ,3
4. Lick, Rainer, F. u. Eberhagen, D.; unveröffentlicht
5. Bergmeyer, H.U., Methoden der enzymatischen Analyse, Wein-
heim, 1962, 50
6. Rapoport, Medizinische Biochemie, Berlin, 1966 166 ff;
7. Zöllner, N. und Eberhagen, D. Untersuchungen und Bestim-
mungen der Lipide im Blut, Berlin, Heidelberg, New York
1965 , 228 ff
8. Preparation of samples for Liquid-Scintillation-Counting,
Nuclear Chicago, 140. 206;
9. Kortun, G. Kolorimetrie, Photometrie, Spektrometrie,
Berlin 1962
10. Sigmund-Schütte-Körber, Praktikum der Physiologischen
Chemie, Berlin 1970 , 151
11. Henning, N. Klinische Laboratoriumsdiagnostik , 707 ff.
12. Detferrmann, H., Gel-Chromatographie, Berlin, Heidelberg,
New York, 1967.
13. Rapoport, S.U., Medizinische Biochemie, Berlin, 1966, 80
14. Leuthardt, F. Lehrbuch der physiologischen Chemie, Berlin,
1963, 91 ff.
15. Bergmeyer, H.U. , Methoden der enzymatischen Analyse ,
Weinheim, 1962, 350 .

16. Dokumenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 1968, 419 ff.
17. Zöllner, N.u. Eberhagen, D., Untersuchungen und Bestimmungen der Lipide im Blut, Berlin, Heidelberg, New York, 1965, 281 .
18. Glick, D., Dich, Z. Methods of Biochemical Analysis, New York, London, 1954- 1967, 320 ff.
19. Clotten, R. Hochspannungselektrophorese, Stuttgart, 1962.
20. Waldi, D., Sprühreagentien für die Dünnschichtchromatographie, in Stahl, E., Dünnschichtchromatographie, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1962, 501 .
21. Brenner, M., Niederwieser, A., und Pataki, G., Aminosäuren und Derivate in Stahl, E., Dünnschichtchromatographie, 404 ff
22. Snyder, F. und Stephans, N., Report Nr.41 , 1962, Oak Ridge Institute of Nuclear Studies.
23. Westrich , Sammlung mathematischer Formeln, München, 1960, 63.

Die vorliegende Arbeit wurde im Isotopenlabor der Medizinischen Poliklinik unter Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. D. Eberhagen ausgeführt.

Mein besonderer Dank für die Themenstellung sowie für die fördernde Diskussion gilt in erster Linie Herrn Priv. Doz. Dr. F.R. Lick. Ganz besonders möchte ich auch Herrn Priv. Doz. Dr. D. Eberhagen für die persönliche Betreuung und die richtungsweisende Unterstützung bei dieser Arbeit bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank auch der medizinisch-technischen Assistentin ,Fräulein H. Bücher, deren praktische Hilfe mir sehr wertvoll war.

Lebenslauf

Am 16.7.1943 wurde ich als Sohn des Forstdirektors Otto Leuze und seiner Ehefrau Franziska, geb.Hueber, in Neuhofen, Krs. Pfarrkirchen, geboren.

Von 1949 - 1953 besuchte ich die Volksschule, von 1953 - 1957 die Oberrealschule in Zwiesel. Im Juli 1962 legte ich in Mühldorf die Reifeprüfung ab.

Von 1.9.1962 - 30.8.1964 leistete ich meinen Wehrdienst bei der Bundeswehr, wo ich als Leutnant der Reserve ausschied.

Im Winter-Semester 1964 begann ich das Studium der Zahnheilkunde an der Ludwig-Maximilians-Universität in München und beendete es im Herbst 1969 mit dem Staatsexamen. Seitdem bin ich in der Praxis Dr. Dr. K. Hemmerich, Facharzt für Mund- und Kieferchirurgie, München, als Assistenz-Zahnarzt tätig.

